

MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
INSTITUȚIA PUBLICĂ INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

Cu titlu de manuscris

CZU: 573.6+602.3 : 582.232.2+579.222.4

DJUR SVETLANA

**BIOTEHNOLOGII DE OBTINERE A PREPARATELOR CU
CONȚINUT SPORIT DE SELENIU ȘI GERMANIU ÎN BAZA
BIOMASEI DE SPIRULINĂ**

167.01. BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

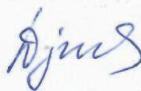
Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:



Rudic Valeriu, academician, doctor
habilitat în științe biologice, profesor
universitar, Om Emerit al R.Moldova

Autor:



Djur Svetlana

CHIȘINĂU, 2021

© Djur Svetlana, 2021

CUPRINS

ADNOTĂRI (română, rusă, engleză).....	5
LISTA TABELELOR	8
LISTA FIGURILOR	9
LISTA ABREVIERILOR	11
INTRODUCERE	12
1. SELENIUL, GERMANIUL ȘI SPIRULINA - COMPONENTE DE VALOARE ALE PREPARATELOR ȘI SUPLIMENTELOR ALIMENTARE	19
1.1 Seleniul - microelement important pentru organismul uman și animal.....	19
1.2 Proprietățile biologice distincte ale germaniului.....	28
1.3 <i>Arthrospira platensis</i> (spirulina) – sursă de materii prime biologice active.....	33
1.4 Concluzii la capitolul 1.....	42
2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE	44
2.1 Obiectul de studiu.....	44
2.2 Compuși ai seleniului și germaniului.....	45
2.3 Metodele de cercetare.....	45
2.3.1 <i>Determinarea conținutului de biomasă de spirulină</i>	45
2.3.2 <i>Determinarea conținutului de proteine în biomasa de spirulină</i>	47
2.3.3 <i>Determinarea conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină</i>	50
2.3.4 <i>Determinarea conținutului de glucide în biomasa de spirulină cu utilizarea reagentului antron</i>	51
2.3.5 <i>Determinarea conținutului de lipide în biomasa de spirulină</i>	52
2.3.6 <i>Determinarea produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa de spirulină, testul TBARS</i>	54
2.3.7 <i>Determinarea activității antioxidante cu utilizarea radicalului ABTS^{•+}</i>	56
2.3.8 <i>Determinarea conținutului de seleniu în biomasa de spirulină</i>	57
2.3.9 <i>Determinarea în biomasa de spirulină a conținutului de germaniu</i>	59
2.3 Concluzii la capitolul 2.....	61
3. ELABORAREA BIOTEHNOLOGIEI DE OBTINERE A PREPARATELOR CU CONȚINUT SPORIT DE SELENIU ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ	62
3.1 Efectul unor compuși anorganici ai Se (IV) asupra producerii de biomasă, acumulării seleniului și compoziției biochimice a tulpinii cianobacteriei <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11 (spirulina).....	63
3.1.1 <i>Cantitatea de biomasă și conținutul de seleniu acumulat la cultivarea A. platensis CNMN-CB-11 în prezența unor compuși anorganici ai Se (IV)</i>	65
3.1.2 <i>Compoziția biochimică a biomasei de A. platensis CNMN-CB-11 la cultivare în prezența unor compuși anorganici ai Se (IV)</i>	69
3.1.2.1 <i>Evaluarea conținutului produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa de A. platensis CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor anorganici ai Se (IV)</i>	78
3.1.2.2 <i>Modificarea activității antioxidante în procesul de acumulare a seleniului în biomasa de A. platensis CNMN-CB-11</i>	80
3.2 Procedee de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu bioorganic	82

3.3	Tehnologia integrată de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu în baza biomasei de spirulina.....	88
3.3.1	<i>Testarea în condiții de producere în serie a tehnologiei de obținere a produselor (preparatelor și suplimentelor selenorganice) în baza biomasei de spirulină.....</i>	95
3.4	Concluzii la capitolul 3.....	99
4.	ELABORAREA BIOTEHNOLOGIEI DE OBȚINERE A PREPARATELOR CU CONȚINUT SPORIT DE GERMANIU ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ.....	100
4.1	Cantitatea de biomasă, nivelurile de acumulare a germaniului și compoziția biochimică a tulpinii cianobacteriei <i>Arthrospira platensis</i> CNMN-CB-11 (spirulina) la cultivare în prezența unor compuși anorganici și organici ai Ge (IV).....	100
4.1.1	<i>Cantitatea de biomasă și conținutul de germaniu, acumulate de către A. platensis CNMN-CB-11 la cultivare în prezența unor compuși chimici ai Ge (IV).....</i>	102
4.1.2	<i>Conținutul unor compuși biologic activi în biomasa de A. platensis CNMN-CB-11 cultivată în prezența compușilor anorganici și organici Ge (IV).....</i>	106
4.1.3	<i>Conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasă și activitatea antioxidantă (în baza extractelor hidrice) a tulpinii cianobacteriei A. platensis CNMN-CB-11 cultivată în prezența compușilor Ge (IV).....</i>	114
4.2	Procedeu de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de germaniu.....	117
4.3	Tehnologia integrată de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de germaniu (sau germaniu și seleniu).....	121
4.3.1	<i>Reproducerea fluxului tehnologic de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de germaniu în condiții de producere în serie.....</i>	124
4.3.2	<i>Variante tehnologice de obținere a biomasei de spirulină, îmbogățite cu germaniu și seleniu (sau seleniu și germaniu) - materie primă biologic activă pentru fabricarea preparatelor policomponente ce conțin ambele microelemente.....</i>	127
4.4	Concluzii la capitolul 4.....	129
	CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	130
	BIBLIOGRAFIE.....	134
	ANEXE.....	164
	Anexa 1. Brevete de invenție.....	165
	Anexa 2. Acte de implementare a tehnologiilor de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de seleniu și germaniu.....	167
	Anexa 3. Diplome la Saloanele și Expozițiile Internaționale de Invenții.....	169
	DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	177
	CV-ul AUTORULUI.....	178

ADNOTARE

Djur Svetlana: „Biotehnologii de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu și germaniu în baza biomasei de spirulină”, teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2021.

Structura tezei: introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 332 titluri, 3 anexe, 122 pagini text de bază, 24 de figuri, 20 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 22 de lucrări științifice.

Cuvinte - cheie: *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, spirulina, biomasă, preparate, suplimente, seleniu organic, germaniu organic.

Scopul lucrării: elaborarea biotehnologiilor de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu și/sau germaniu în baza biomasei tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11.

Obiectivele cercetării: Stabilirea efectului unor compuși anorganici ai Se (IV), anorganici și organici ai Ge (IV) asupra capacității de producere a biomasei și de acumulare a seleniului și germaniului de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11; Evaluarea modificărilor produse în conținutul unor componente biologice active majore (proteinele, ficobiliproteinele, glucidele, lipidele) din biomasă pe fonul seleniului și germaniului acumulat de către spirulina; Elaborarea procedurilor de cultivare a spirulinei în condițiile care asigură obținerea unei biomase cu conținut sporit de seleniu și germaniu biotransformate; Elaborarea schemelor tehnologice de obținere în cadrul unui singur flux a produselor (preparatelor și suplimentelor) ce conțin seleniul și/sau germaniul ca parte componentă efectivă.

Noutatea și originalitatea științifică: Au fost selectați compușii Se (IV) și Ge (IV), și stabilite limitele de concentrații și parametrii optimați care asigură nivelul maximal de acumulare a seleniului și respectiv, a germaniului de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, și care nu afectează producerea de biomasă, compoziția biochimică și nivelul de siguranță (confirmat prin testul DAM) al acestei biomase. S-a demonstrat natura bioorganică a seleniului și germaniului acumulat în biomasa de spirulină prin nivelul înalt de repartizare a acestor elemente în fracțiile biologice active (aminoacizi, oligopeptide, proteine, lipide și glucide).

Rezultatul obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în fundamentarea științifică a capacității tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 de a acumula și biotransforma seleniul și germaniul din compuși chimici, ceea ce a condus la elaborarea unor procedee noi de obținere a biomasei de spirulină îmbogățite cu seleniu și/sau germaniu, fapt ce a permis obținerea din această biomasă, în cadrul unui singur flux tehnologic, a preparatelor noi cu conținut sporit al acestor elemente de importanță biologică.

Semnificația teoretică: Au fost acumulate date noi despre caracterul acțiunii unor compuși chimici ai Se (IV) și Ge (IV) asupra capacității de producere a biomasei de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, precum și despre nivelul și condițiile de acumulare a seleniului și germaniului de către această tulpină. Au fost elucidate modificările în compoziția biochimică, conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor și în nivelul activității antioxidante pe parcursul procesului de acumulare a seleniului și germaniului de către spirulina.

Valoarea aplicativă: Au fost elaborate 3 procedee de obținere a biomasei de spirulină îmbogățită cu seleniu și/sau germaniu; Au fost elaborate schemele tehnologice de obținere în cadrul unui singur flux de fabricare a 9 variante de preparate noi cu conținut sporit de seleniu și/sau germaniu. Selenura de germaniu oferă oportunitatea obținerii în baza biomasei de spirulină a materiilor prime biologice active ce conțin în cantități sporite ambele microelemente.

Implementarea rezultatelor științifice: rezultatele au fost implementate la uzina FICOTEHFARM SRL, or. Chișinău, R. Moldova (Acte de implementare Nr. 01-11/2017 și Nr. 02-11/2017 din 30.11.2017).

АННОТАЦИЯ

Джур Светлана: “Биотехнологии получения препаратов с повышенным содержанием селена и германия на основе биомассы спироулины”. Диссертация кандидата биологических наук, Кишинев, 2021.

Структура диссертации: введение, четыре главы, выводы и рекомендации, список литературы из 332 источников, 3 приложения, 122 страницы основного текста, 24 рисунка, 20 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 22 научных работах.

Ключевые слова: *Arthrospira platensis* (спироулина), биомасса, препараты, биодобавки, органический селен, органический германий.

Цель работы: разработка биотехнологий получения препаратов с повышенным содержанием селена и/или германия на основе биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11.

Задачи исследований: Изучение влияния некоторых неорганических соединений Se (IV), неорганических и органических соединений Ge (IV) на накопление биомассы, селена и германия штаммом цианобактерии *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11; Оценка изменения содержания основных биологически активных веществ (белков, фикобилипротеидов, углеводов, липидов) в составе биомассы на фоне накопления селена и германия; Разработка способов культивирования спироулины в условиях, обеспечивающих получение биомассы с высоким содержанием селена и германия; Разработка технологических схем получения в едином цикле производства препаратов и биодобавок, содержащих селен и/или германий в качестве их составляющей.

Научная новизна и оригинальность: Были выбраны соединения Se (IV) и Ge (IV) и установлены оптимальные пределы концентраций и параметров, обеспечивающих максимальный уровень накопления селена и германия цианобактерией *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, которые не влияют отрицательно на продуктивность, биохимический состав и уровень безопасности биомассы (подтверждено тестом MDA). Биоорганическая природа селена и германия, аккумулярованных в биомассе спироулины, продемонстрирована высоким уровнем распределения этих элементов в биологически активных фракциях (аминокислоты, олигопептиды, белки, липиды и углеводы).

Результат, который способствует решению научной проблемы в диссертации состоит в научном обосновании способности цианобактерии *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 накапливать и биотрансформировать селен и германий из химических соединений, что способствовало разработке новых способов получения биомассы, обогащенной селеном и/или германием, что позволило получить из этой биомассы в едином технологическом цикле новые препараты с высоким содержанием этих важных элементов.

Теоретическая значимость: Были получены новые данные о характере действия некоторых химических соединений Se (IV) и Ge (IV) на продуктивность цианобактерии *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, а также об уровне и условиях накопления этим штаммом селена и германия. Выявлены изменения биохимического состава, содержания продуктов окислительной дегградации липидов и уровня антиоксидантной активности в процессе накопления в биомассе спироулины селена и германия.

Практическая ценность: разработаны 3 способа получения биомассы спироулины, обогащенной селеном и/или германием; Были разработаны схемы получения в едином технологическом цикле 9 вариантов новых препаратов с повышенным содержанием селена и/или германия. Селенид германия является перспективным для получения на основе биомассы спироулины биологически активного сырья, содержащего в больших количествах оба микроэлемента.

Внедрение научных результатов: полученные результаты были внедрены на фармацевтической фабрике FICOTENFARM SRL, г. Кишинев, Республика Молдова (Акты внедрения № 01-11/2017 и 02-11/2017 от 30.11.2017).

ANNOTATION

Djur Svetlana: „Biotechnologies for obtaining spirulina-based preparations with high selenium and germanium content”. PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2021.

The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 332 references. It comprises 122 pages of the main text, 24 figures, 20 tables and 3 annexes. The results were published in 22 scientific papers.

Keywords: *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, spirulina, biomass, preparations and supplements, organic selenium, organic germanium.

Aim: Development of biotechnologies for obtaining preparations with a high content of selenium and/or germanium based on biomass of cyanobacterial strain *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11.

Objectives: To establish the effect of some inorganic compounds of Se (IV), inorganic and organic compounds of Ge (IV) on biomass production and accumulation of selenium and germanium by cyanobacterial strain *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11; to assess the changes in the content of major biologically active components (proteins, phycobiliproteins, carbohydrates, lipids) in the composition of biomass on background of selenium and germanium accumulated by spirulina; to elaborate proceedings for spirulina cultivation under conditions that ensure the production of biomass with high content of biotransformed selenium and germanium; to develop technological schemes for one-stage production of preparations and supplements containing selenium and/or germanium as an effective component.

Scientific novelty: The compounds Se (IV) and Ge (IV) have been selected, and their concentration limits and optimal parameters ensuring the maximum level of selenium and germanium accumulation by cyanobacterial strain *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, which do not affect productivity, biochemical composition and safety aspects (confirmed by the MDA test) of biomass production. The bioorganic nature of selenium and germanium accumulated in spirulina biomass was demonstrated by the high level of distribution of these elements in biologically active fractions (amino acids, oligopeptides, proteins, lipids and carbohydrates).

Solved scientific problem: *scientific foundation* of the capacity of cyanobacterium *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 strain to accumulate and biotransform selenium and germanium from chemical compounds *that led to* the elaboration of new *proceedings* for obtaining spirulina biomass enriched with selenium and/or germanium, *which allowed* one-stage production of new preparations with a high content of these biologically important elements.

Theoretical significance: New data have been accumulated about the action of chemical compounds Se (IV) and Ge (IV) on the productivity of cyanobacterium *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, as well as the level and conditions of selenium and germanium accumulation by this strain. Changes in biochemical composition, content of lipid oxidation products, and antioxidant activity of biomass in the process of selenium and germanium accumulation by spirulina were revealed.

Applicative value: There have been developed 3 new *proceedings* to obtain selenium and/or germanium enriched spirulina biomass. The technological schemes with a single manufacturing cycle for 9 new preparation variants with high selenium and/or germanium content were elaborated. Germanium selenide offers the opportunity to obtain biologically active raw materials containing increased quantities of both trace elements based on spirulina biomass.

Implementation of scientific results: the results were implemented at FICOTEHFARM SRL, Chisinau, Republic of Moldova (Implementation Acts No. 01-11/2017 and No. 02-11/2017 of 30.11.2017).

LISTA TABELELOR

Tabelul	Denumirea	Numărul paginii
1.1.	Unele exemple de produse ce conțin seleniul, forma microelementului din produs și prețul estimativ	26
1.2.	Unele exemple de preparate germaniucomponente	32
3.1.	Conținutul de seleniu, adăugat la mediul de cultivare (în dependență de concentrația compusului) și seleniul acumulat în biomasa de spirulină	68
3.2.	Corelarea dintre concentrația compusului seleniului și cantitatea acumulată de seleniu în biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11	69
3.3.	Nivelul de biomasă produsă și cantitatea de seleniu acumulat în prezența selenitului de fier hexahidrat (50 mg/l) suplimentat în rate și la diferite perioade de cultivare a <i>A. platensis</i>	83
3.4.	Nivelul de biomasă produsă și cantitatea de seleniu acumulat la cultivarea <i>A. platensis</i> în prezența selenurii de germaniu (30 mg/l) suplimentată în rate și la diferite perioade de cultivare	84
3.5.	Compoziția biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu	89
3.6.	Activitatea antioxidantă (extract hidro-alcoolic de 50%, standardizat la concentrația de 1 mg substanță uscată/ml) a biomasei de spirulină selenorganice	89
3.7.	Parametrii de control interfazic și finit în procesul de producere în serie a biomasei selenorganice de spirulină (<i>Spirulina selenorganică</i> - 1)	97
3.8.	Parametrii de control calitate - interfazic și finit în procesul de producere în serie a biomasei selenorganice de spirulină (<i>Spirulina selenorganică</i> - 1)	97
3.9.	Parametrii de control calitate - interfazic și finit în procesul de producere în serie a extractului de aminoacizi și oligopeptide selenorganice (<i>BioR-Selenium 1</i>)	98
3.10.	Parametrii de control calitate - interfazic și finit în procesul de producere în serie a extractului proteic selenorganic (<i>Supliment Se-proteic 1</i>)	98
4.1.	Conținutul germaniului acumulat în biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici și organici ai Ge (IV)	103
4.2.	Corelarea dintre concentrația compusului și conținutul germaniului acumulat în biomasă	105
4.3.	Nivelul de producere a biomasei (% Martor) și conținutul de germaniu acumulat (mg%) la cultivarea spirulinei în prezența selenurii de germaniu suplimentată în concentrație de 30 mg/l în diferite intervale ale procesului de cultivare	118
4.4.	Conținutul unor compuși biologic activi în biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu	121
4.5.	Parametrii de control interfazic și finit în procesul de producere în serie a biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu (<i>Biomasa germaniuorganică</i>)	125
4.6.	Parametrii de control calitate a biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu la producerea în serie (<i>Biomasa germaniuorganică</i>)	125
4.7.	Parametrii de control interfazic și finit în procesul de fabricare a extractului de aminoacizi și oligopeptide germaniucomponente (<i>BioR-Germanium</i>)	126
4.8.	Parametrii de control interfazic și finit în procesul de fabricare a suplimentului proteic germaniuorganic (<i>Supliment Ge-proteic</i>)	126

LISTA FIGURILOR

Fig.	Denumirea	Numărul paginii
1.1.	Schema generalizată a metabolismului compușilor seleniului în organismul uman [84]	22
3.1.	Design-ul cercetărilor realizate în vederea elaborării tehnologiei de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu în baza biomasei de spirulină	62
3.2.	Metabolismul seleniului în celulele algale [221]	63
3.3.	Cantitatea de biomasă (g/l) și conținutul de seleniu acumulat (mg%) la cultivarea <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 în prezența compușilor: A - Na ₂ SeO ₃ , (NH ₄) ₂ SeO ₃ , Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O și B - CoSeO ₃ , ZnSeO ₃ , GeSe ₂	66
3.4.	Conținutul de proteine (% BAU) în biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na ₂ SeO ₃ , (NH ₄) ₂ SeO ₃ , Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O și B - ZnSeO ₃ , GeSe ₂ , CoSeO ₃	71
3.5.	Conținutul de ficobiliproteine (% BAU) în biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na ₂ SeO ₃ , (NH ₄) ₂ SeO ₃ , Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O și B - ZnSeO ₃ , GeSe ₂ , CoSeO ₃	73
3.6.	Conținutul de glucide (% BAU) în biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na ₂ SeO ₃ , (NH ₄) ₂ SeO ₃ , Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O și B - ZnSeO ₃ , GeSe ₂ , CoSeO ₃	75
3.7.	Conținutul de lipide (% BAU) în biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na ₂ SeO ₃ , (NH ₄) ₂ SeO ₃ , Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O și B - ZnSeO ₃ , GeSe ₂ , CoSeO ₃	76
3.8.	Cantitatea de dialdehidă malonică (DAM, nM/g) în biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na ₂ SeO ₃ , (NH ₄) ₂ SeO ₃ , Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O și B - ZnSeO ₃ , GeSe ₂ , CoSeO ₃	79
3.9.	Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice (% inhibiție ABTS) din biomasa de <i>A. platensis</i> CNMN-CB-11 și nivelul seleniului acumulat (mg%) la cultivare în prezența compușilor: A - Na ₂ SeO ₃ , (NH ₄) ₂ SeO ₃ , ZnSeO ₃ , CoSeO ₃ și B - GeSe ₂ , Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O	80
3.10.	Distribuția seleniului în diferite fracții biologic active ale biomasei de spirulină obținută (A) - în prezența selenitului de fier hexahidrat și (B) - în prezența selenurii de germaniu	85
3.11.	Schema generalizată de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu	86
3.12.	Schema generalizată de obținere în cadrul unui circuit tehnologic a produselor (preparatelor și suplimentelor) ce conțin seleniul ca parte componentă efectivă	91
4.1.	Conținutul de germaniu acumulat (mg%) și cantitatea de biomasă (g/l), obținută la cultivarea spirulinei în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)	104
4.2.	Conținutul de proteine (% BAU) în biomasa de spirulina, cultivată în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)	107
4.3.	Conținutul de ficobiliproteine (% BAU) în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)	109
4.4.	Conținutul de glucide (% BAU) în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)	111
4.5.	Conținutul de lipide (% BAU) în biomasa de spirulină, obținută la	

	cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)	112
4.6.	Raportul dintre conținutul de dialdehidă malonică – DAM (nM/g) și nivelul de acumulare a germaniului (mg%) în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)	114
4.7.	Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS) a extractelor hidrice din biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)	115
4.8.	Repartizarea germaniului în diferite fracții biologice active ale biomasei de spirulină cu conținut sporit de germaniu	119
4.9.	Schema de obținere a biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu	120
4.10.	Schema integrată de obținere în cadrul unui singur ciclu tehnologic a produselor (preparatelor și suplimentelor) germaniuorganice	123
4.11.	Etapele tehnologice principale de obținere a biomasei de spirulină, îmbogățite cu germaniu și seleniu (sau seleniu și germaniu)	128

LISTA ABREVIERILOR

GSH – glutation;
Met – metionină;
Cys – cisteină;
Se-Cys – selenocisteină;
Se-Met – selenometionină;
OMS – Organizația Mondială a Sănătății;
SBA – substanțe biologice active;
BAU – biomasa absolută uscată;
Ca-SP – Calciu - Spirulan;
Na-SP – Sodiu - Spirulan;
SPV – sulfo-fosfo-vanilină;
DAM – dialdehidă malonică;
TBARS – substanțe reactive ale acidului tiobarbituric;
ATB – acid tiobarbituric;
ABTS – 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid;
TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity;
GOST – Standard al Federației Ruse;
BCTA – bromură de cetil - trimetil - amoniu;
APSe – fosfoselenat de adenozină;
OAS – O-acetilserină;
MMT – metilmetionină metiltransferază;
DMSeP – dimetilselenopropionat;
DMDS – dimetil (di) selenură;
SMT – selenocisteină metiltransferază.

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate:

În ultimele decenii a crescut interesul către cultivarea în proporții industriale a cianobacteriilor și microalgelor în calitate de surse de compuși biologic activi cu valoare funcțională înaltă astfel ca aminoacizii, oligopeptidele, proteinele, lipidele, polizaharidele, pigmentii, enzimele antioxidante ș. a.

Biomasa cianobacteriană și microlagală este o componentă prețioasă a diverselor produse (suplimente alimentare și preparate), iar îmbogățirea acestora cu microelemente esențiale (fierul, zincul, cuprul, cromul ș. a.) în formă biodisponibilă lărgeste considerabil posibilitățile utilizării ei în continuare în nutriție, dar și în diverse domenii ale medicinei contemporane, care pune tot mai mult accentul pe prevenirea disfuncțiilor metabolice - cauză a patogenezei multor afecțiuni ale sistemelor cardiovascular și endocrin, nervos și hematopoietic [12, 56, 89, 301, 319]. Este evidentă necesitatea substituirii aditivilor și suplimentelor chimice de sinteză prin produse naturale, obținute în condiții ecologice monitorizate. Cianobacteriile și microalgele, datorită capacității de acumulare și biotransformare a bioelementelor, inclusiv seleniului și germaniului, reprezintă materiile prime oportune pentru a fi valorificate în acest scop.

Din diversitatea de specii cianobacteriene și microalgale se remarcă specia *Arthrospira platensis* (spirulina) și diverse tulpini ale ei. Spirulina este cunoscută, în primul rând, pentru consumul în calitate de aliment/supliment. În prezent spirulina este valorificată și investigată în calitate de matrice pentru producerea pe scară largă a diferitor substanțe biologic active cu efecte benefice asupra sănătății. Spirulina posedă inclusiv, mecanisme de acumulare a elementelor în special a celor cu rol de bioelemente. La acest proces participă componentele sale structurale transformând elementele din forma lor anorganică în cea organică, care poate fi inclusă, datorită toxicității foarte scăzute și, respectiv, a biodisponibilității lor înalte în compoziția diverselor preparate și produse specializate [56, 95, 81, 103, 111, 172, 191, 209, 216, 227, 319, 324].

Obiect preferențial al ficobiotehnologiilor industriale moderne în majoritatea țărilor de pe glob, spirulina prezintă o serie de avantaje printre care: lipsa toxinelor, demonstrată prin testul ELISA, compoziția biochimică complexă reprezentată de cei circa 50 compuși biologic activi ai săi, inclusiv vitamine și microelemente și un metabolism foarte labil al acestora, precum și rezistența înaltă la diverși factori stresogeni ai mediului – datorită mecanismelor de adaptare dezvoltate evolutiv. Durata ciclului de creștere foarte mică – 6 - 10 zile, permite obținerea în condiții industriale într-un termen foarte scurt a biomasei și compușilor biologic activi, iar

proiectarea și construcția de cultivatoare cu includerea unor parametri de cultivare necesită costuri relativ mici [12, 41, 71]. În Republica Moldova spirulina este cultivată la întreprinderea ficologică FICOTEHFARM SRL cu sediul în mun. Chișinău și întreprinderea GIDROFIT cu sediul în raionul Slobozia. Aceste întreprinderi propun spre consum atât biomasa de spirulină, cât și unele produse biologic active în baza ei.

Pentru ca biomasa în calitate de materie primă și produsele, care în special conțin bioelementele ca parte componentă distinctă a lor să fie competitive și funcționale, cercetările asupra spirulinei trebuie să preceute și să ofere soluții referitor la compoziția optimală a mediului nutritiv; stabilirea parametrilor optimali de cultivare (pH-ul mediului, iluminarea și temperatura); căile de modificare a proceselor biosintetice în scopul acumulării compușilor biologic activi și a bioelementelor ca componente efective. Este important să se stabilească condițiile și să se elaboreze modele de evitare a stresului oxidativ indus de condițiile tehnologice. Tehnologiile intensive de cultivare a spirulinei în scopul încorporării unor bioelemente nespecifice condițiilor de cultivare presupun activarea și intensificarea activității biosintetice a cianobacteriei cu formarea și acumularea radicalilor liberi, care pot compromite biomasa rezultată în calitate de materie primă pentru elaborarea produselor finale scontate. Este importantă selectarea și argumentarea tehnicilor și metodelor de verificare a calității biomasei rezultate pentru evitarea excesului de radicali sau remodelarea unor etape tehnologice în vederea obținerii unui profit din stres oxidativ produs. Tehnicile de procesare și purificare trebuie să utilizeze solvenți nontoxici pentru a reduce costurile de producție, dar și pentru a asigura inofensivitatea preparatelor policomponente create în baza biomasei de spirulină.

Seleniul este unul dintre microelementele, deficitul cărora este cel mai frecvent determinat în populația planetei [266]. Seleniul pătrunde în organismul uman din sol prin produsele de origine vegetală și animală, astfel încât nivelul de asigurare cu acest microelement depinde de condițiile geochimice ale habitatului [133]. Seleniul este absolut necesar pentru dezvoltarea normală a oricărui organism viu [48, 61, 79, 93, 134]. Acest microelement activează procesele de respirație tisulară, reglează reacțiile de oxido-reducere, influențează activitatea imună, metabolismul proteic, în particular metabolismul aminoacizilor ce conțin sulf, este parte componentă a majorității hormonilor și enzimelor. Rolul seleniului în organism este determinat, în principal, de includerea lui în componența uneia dintre enzimele antioxidante principale - glutathionperoxidaza [85, 127, 283].

Germaniul este nu mai puțin important pentru organismul uman. Germaniul organic (prin proprietățile similare hemoglobinei) previne dezvoltarea așa numitei stări de „hipoxie sanguină” care survine în cazul diminuării nivelului de saturație cu oxigen a sângelui, determinată în caz de

hemoragii, intoxicații cu monoxid de carbon și radiație. Sensibilitate sporită față de germaniu manifestă: sistemul nervos central, inima, țesutul renal și cel hepatic [139, 152].

Germaniul blochează radicalii liberi în organism și intervine pozitiv în sistemul imunitar al organismului prin activarea macrofagelor și limfocitelor T. Germaniul (organic) poate preveni acumularea de metale grele în organism. De asemenea, acest oligoelement posedă proprietăți antifungice, antivirale, antibacteriene și previne apariția metastazelor, reglează peristaltica și sistemul de valve a sistemului digestiv și cel venos; reduce doliitatea (compușii germaniului blochează fluxul de electroni în celulele nervoase) [31, 72, 119, 152, 174, 178, 224, 244, 282, 286, 288, 316].

Astfel, spirulina întrunește toate criteriile, atât cele de calitate, cât și cele tehnologice pentru a obține din biomasa sa produse (preparate și suplimente) ce conțin în cantități sporite aceste două oligoelemente importante pentru organismul uman și animal [79, 93, 176, 178, 213, 224, 282, 298, 316], biotransformate de către compușii săi biologic activi în procesul de cultivare a ei în condiții dirijate.

Scopul lucrării: Elaborarea unor biotehnologii de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu și germaniu în baza biomasei tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina).

Obiectivele cercetării:

- (1) Stabilirea efectului unor compuși anorganici ai Se (IV), anorganici și organici ai Ge (IV) asupra capacității de producere a biomasei și de acumulare a seleniului și germaniului de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11;
- (2) Evaluarea modificărilor produse în conținutul unor componente biologic active majore (proteine, ficobiliproteine, glucide, lipide) din compoziția biomasei pe fonul seleniului și germaniului acumulat de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11;
- (3) Elaborarea procedeelor de cultivare a tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 în condițiile care asigură obținerea unei biomase cu conținut sporit de seleniu și germaniu biotransformate;
- (4) Elaborarea schemelor tehnologice de obținere în cadrul unui singur flux a produselor (preparatelor și suplimentelor) ce conțin seleniul și/sau germaniul ca parte componentă efectivă.

Ipoteza de cercetare:

Capacitatea tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) de a acumula în condiții controlate și a biotransforma prin compușii săi biologic activi seleniul și

germaniul, precum și procedeele inofensive de extragere succesivă a lor în cadrul unui singur ciclu tehnologic, asigură obținerea unor produse (preparate și suplimente) ce conțin ca parte componentă distinctă aceste două oligoelemente cu proprietăți biologice importante.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese:

Setul de metode selectate în cercetare este cel aplicat în ficobiotehnologia modernă și a inclus un șir de tehnici și procedee analitice adaptate la obiectul de studiu. Aceste metode se referă la determinarea conținutului de biomasă produsă de către tulpina utilizată în studiu, precum și la determinarea cantității acumulate de seleniu și germaniu, dar și a principalilor indicatori de calitate (proteinele, ficobiliproteinele, glucidele, lipidele) în această biomasă.

Pentru a monitoriza siguranța biomasei de spirulină și a preparatelor cu conținut sporit de seleniu și germaniu au fost utilizate două teste: testul de reducere a radicalului cation ABTS⁺ și testul dialdehidei malonice (DAM).

Pentru stabilirea veridicității și autenticității datelor experimentale obținute a fost aplicat instrumentarul standard de analiză statistică (din componența Microsoft Excel 2010).

Sumarul compartimentelor tezei:

Teza conține partea de introducere și 4 capitole. Primul capitol reprezintă reviu de sinteză a informației expuse în literatura de specialitate, cu referire la problema abordată în teză. Capitolul doi prezintă baza de cercetare, obiectul, materialul și metodele de investigare. Partea experimentală și analiza ei este structurată în capitolul trei și patru a lucrării. Lucrarea finalizează cu concluzii generale și recomandări și conține compartimentul cu Anexe.

Capitolul 1 „SELENIUL, GERMANIUL ȘI SPIRULINA - COMPONENTE DE VALOARE ALE PREPARATELOR ȘI SUPLIMENTELOR ALIMENTARE” include o analiză a datelor existente la momentul actual în literatura de specialitate cu privire la importanța seleniului și a germaniului pentru organismul uman, asupra diferitor preparate ce conțin aceste oligoelemente, precum și asupra formei lor din aceste preparate. Este elucidat metabolismul seleniului și germaniului în organism și importanța lor pentru sănătate. Sunt trecute în revistă proprietățile terapeutice ale seleniului și germaniului descrise în publicațiile științifice.

Actualitatea și necesitatea obținerii de noi preparate polifuncționale care conțin seleniu și germaniu în baza cianobacteriei *Arthrospira platensis* (spirulina) a fost argumentată în rezultatul unei analize a pieței moderne a preparatelor și suplimentelor alimentare ce conțin seleniul sau germaniul la nivel mondial. Este prezentată valoarea cianobacteriei *Arthrospira platensis* ca obiect biotehnologic, datorită utilizării sale cu succes în calitate de materie primă pentru fabricarea produselor farmaceutice și alimentare.

Arthrospira platensis rămâne în continuare o sursă promițătoare de un șir de compuși biologic activi și poate fi considerată un biotransformator eficient al oligoelementelor din formele anorganice în cele organice și poate, de asemenea, fi utilizată ca o sursă de noi agenți imunomodulatori, hepatoprotectori, antitumorali. Sinteza literaturii prezentată în acest capitol oferă un suport teoretic important pentru cercetările reflectate în capitolele experimentale.

Capitolul 2 „OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE” prezintă baza de cercetare, obiectul, materialul și metodele utilizate pe durata efectuării lucrării. Lucrarea a fost realizată în cadrul laboratorului Ficobiotehnologie al Universității de Stat din Moldova, laboratorului Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, uzinei FICOTEHFARM, orașul Chișinău.

În calitate de obiect de studiu a fost selectată tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina), o tulpină adaptată condițiilor tehnologice industriale de cultivare. Tulpina este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene și în Colecția de cianobacterii și microalge a laboratorului Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

Pentru cultivarea spirulinei s-a utilizat mediul nutritiv modificat Zarrouk (varianțe de compoziție). În calitate de surse de microelemente au fost selectate: pentru seleniu – unii compuși anorganici ai Se (IV), iar pentru germaniu – unii compuși anorganici și organici ai Ge (IV).

Au fost utilizate metode și tehnici uzuale adaptate pentru aplicare în investigațiile ficobiotehnologice, în special pentru biomasa de spirulină. Procedurile de determinare a conținutului de biomasă de spirulină, de determinare a cantității de seleniu și germaniu, de evaluare a unor compuși biologic activi în biomasă (proteine, ficobiliproteine, glucide și lipide) au inclus suplimentar tehnici și protocoale aferente care au permis aprecierea siguranței biomasei de spirulină (nivelul activității antioxidante și nivelul de acumulare a produselor degradării oxidative a lipidelor), obținută la cultivare în prezența compușilor seleniului și germaniului.

Setul de formule de prelucrare statistică (Microsoft Excel 2010) a asigurat analiza veridicității rezultatelor obținute.

Capitolul 3 „ELABORAREA BIOTEHNOLOGIEI DE OBȚINERE A PREPARATELOR CU CONȚINUT SPORIT DE SELENIU ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ” începe cu prezentarea etapelor parcurse în partea de cercetare consacrată elaborării biotehnologiei de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor ce conțin seleniu biotransformat. Sunt prezentate datele experimentale obținute la cultivarea tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) cu suplimentarea unor compuși

anorganici ai Se (IV): Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$, $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnSeO_3 , GeSe_2 și CoSeO_3 . Drept rezultat al unui screening preventiv, compuși anorganici Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ și $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ au fost adăugați la mediul de cultivare în concentrații de 10, 20, 30, 40 și 50 mg/l. Pentru compușii ZnSeO_3 și GeSe_2 au fost selectate concentrațiile de 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/l. CoSeO_3 a fost adăugat în patru concentrații: 5, 10, 15, 20 mg/l, concentrațiile lui de peste 20 mg/l fiind letale pentru tulpina dată de spirulină.

Au fost monitorizați astfel de indicatori ca cantitatea de biomasă și nivelul de acumulare a seleniului în aceasta. Au fost stabilite modificările în compoziția biochimică a biomasei (proteine, ficobiliproteine, glucide și lipide), obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici ai Se (IV), în funcție de natura și concentrația lor. Capitolul include, de asemenea, date privind siguranța biomasei îmbogățite cu seleniu: nivelul de activitate antioxidantă și nivelul de acumulare a produselor de peroxidare a lipidelor.

S-a stabilit, că din compușii GeSe_2 și $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ acumularea seleniului în biomasa de spirulină este mai eficientă. Din ceilalți compuși studiați acumularea seleniului de asemenea are loc, dar într-o măsură mai mică, iar biomasa păstrează o compoziție biochimică suficient de echilibrată. Au fost selectați compușii, concentrațiile și intervalul de administrare a lor în procesul de cultivare al spirulinei la parametrii optimali care asigură obținerea de biomasă îmbogățită cu seleniu biotransformat de către fracțiile de aminoacizi liberi și oligopeptide, proteine, glucide. În baza datelor obținute și a concluziilor deduse, au fost elaborate două procedee de obținere a biomasei de spirulină îmbogățită cu seleniu (la cultivarea în prezența selenitului de fier hexahidrat (1) și a selenurii de germaniu (2)).

Au fost dezvoltate două tehnologii de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu. Aceste tehnologii asigură, obținerea în cadrul unui singur flux de fabricare, a 6 compoziții de produse seleniucumponente (*Spirulina selenorganică - 1 și 2, BioR-Selenium 1 și 2 și 2 suplimente Se-proteice*). Tehnologiile sunt reproductibile, valorifică materii prime și materiale non toxice prietenoase mediului și prezintă oportunități de producere în condiții controlate.

Tehnologia de producere elaborată pentru produsele: *Spirulina selenorganică - 1, BioR-Selenium 1 și Supliment Se-proteic 1* a fost testată în condiții de producere în serie la uzina „FICOTEHFARM” SRL, or. Chișinău, R. Moldova (Anexa 2, Act de implementare 01-11/2017 din 30.11.2017).

Capitolul 4 „ELABORAREA BIOTEHNOLOGIEI DE OBȚINERE A PREPARATELOR CU CONȚINUT SPORIT DE GERMANIU ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ” expune datele experimentale privind efectul compușilor anorganici (GeO_2 și

GeSe₂) și organici ai Ge (IV) ((Mes₂GeCl₂ - (FM-1), MesGe(OMe)₂ - (FM-2), ArP = C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu - (FM-3), ArP = C(Te)Ge(Tip)t-Bu - (FM-8), ArP = C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu - (FM-9), ArP = C(PhCH = CHCHO)Ge(Tip)t-Bu - (FM-10) și Mes₂Ge(F)-PHMes - (FM-11)) asupra cantității de biomasă produsă de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, cultivată în prezența lor, precum și dinamica acumulării germaniului și a principalilor compuși biologic activi implicați în biotransformarea acestui oligoelement în biomasă. A fost analizat nivelul de siguranță al biomasei de spirulină pe fonul conținutului de germaniu acumulat.

Selenura de germaniu - GeSe₂ a fost compusul care a asigurat acumularea cantităților cele mai mari de germaniu de către tulpina utilizată de spirulină, comparativ cu dioxidul de germaniu și compușii săi organici. Au fost stabilite condițiile și parametrii de proces optimali care asigură obținerea biomasei de spirulină cu conținut sporit de germaniu la cultivarea spirulinei în prezența GeSe₂. Procedul elaborat, precum și procedeele de extragere succesivă a unor compuși biologic activi care încorporează germaniul, au fost integrate în calitate de elemente – cheie într-un singur circuit de fabricare a 3 produse polifuncționale ce conțin germaniu bioorganic (*Spirulina germaniorganică*, *BioR-Germanium* și *Supliment Ge-proteic*). Schema tehnologică a fost reprodusă în condiții industriale de fabricare la uzina FICOTEHFARM SRL, or. Chișinău, R. Moldova (Anexa 2, Act de implementare 02-11/2017 din 30.11.2017).

Au fost propuse variante tehnologice cu utilizarea selenurii de germaniu, de obținere a biomasei ce conține ambele microelemente (germaniul și seleniul sau seleniul și germaniul), care la fel, poate fi considerată o materie primă biologic activă cu perspectivă de valorificare în condiții de fabricare în serie.

Compartimentul „**CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI**” generalizează concluziile asupra rezultatelor experimentale obținute în lucrare și exprimă valoarea practică a lucrării prin recomandările înaintate. Este evidențiat rezultatul principal al cercetării expuse care a contribuit la soluționarea problemei științifice importante în lucrare, datele privind aprobarea rezultatelor, brevetele obținute, implementarea rezultatelor tezei de doctorat.

Compartimentul „**BIBLIOGRAFIE**” cuprinde cele 332 surse citate în teză.

Compartimentul „**ANEXE**” conține copiile: Brevetelor de invenție 228 MD și 4123 MD (Anexa 1), actelor de implementare Nr. 01-11/2017 și Nr. 02-11/2017 din 30.11.2017 a tehnologiilor elaborate la uzina FICOTEHFARM SRL, or. Chișinău, R. Moldova (Anexa 2), diplomele obținute la Saloanele și Expozițiile Internaționale de Invenții desfășurate la Varșovia, Polonia (2016), Croația (2015), Iasi, Romania (2015, 2014), Osijek, Croația (2014), București, România (2014), Chișinău, Republica Moldova (2013) (Anexa 3).

1. SELENIUL, GERMANIUL ȘI SPIRULINA - COMPONENTE DE VALOARE ALE PREPARATELOR ȘI SUPLIMENTELOR ALIMENTARE

Starea precară a mediului ambiant, dar și intensitatea modului contemporan de viață, stresul, malnutriția, calitatea joasă a alimentelor, alimentația incorectă, sunt printre factorii care provoacă dereglări metabolice și disfuncții ale diferitor sisteme ale organismului uman. Acestea, la rândul lor duc la apariția și instalarea unui șir de afecțiuni și maladii, printre care, cu o rată înaltă a morbidității sunt înregistrate, atât la nivel de țară, cât și mondial, afecțiunile hepatice, cardiopatiile ischemice, diabetul, tuberculoza, cancerul, disfuncțiile sistemului reproductiv ș. a.

Starea precară a mediului ambiant determinată de acțiunea antropogenă masivă – poluarea activă cu diverși toxicanți, este considerată printre factorii-cheie care condiționează apariția patologiilor în organism [36, 143, 146, 208].

O mare parte dintre agenții toxici (toxicanții) se manifestă ca antagoniști ai macro- și microelementelor și, incluzându-se în lanțurile alimentare, elimină din acestea substanțele necesare pentru o derulare normală a proceselor metabolice în organismul uman [304].

Carența de substanțe și microelemente biogene (printre care și seleniul, dar și germaniul) în organism este determinată și de scăderea consumului, dar și de diminuarea calității produselor importante din punctul de vedere al unei alimentații raționale.

„Stresul metabolic” provocat de dezechilibrul metabolic duce la acumularea radicalilor liberi și a produselor peroxidării lipidice care la rândul lor declanșează în organism procese autoimune prin produsele metabolismului dereglat [325].

În calitate de una dintre căile eficiente de prevenire (profilaxie) a diverselor patologii este considerată oportună suplimentarea consumului de alimente și/sau introducerea în diverse terapii a preparatelor sau a produselor policomponente care conțin microelemente importante încorporate în diverși compuși biologic activi obținuți pe cale naturală. În categoria de surse importante pot fi înscrise obiectele ficologice, printre care cianobacteria *Arthrospira platensis* (spirulina). Această specie cianobacteriană conține nu numai substanțe cu diverse și distincte roluri biologice, ci și poate servi drept sursă de oligoelemente biotransformate, menite să asigure integritatea funcțională și în primul rând cea metabolică a organismului uman.

1.1 Seleniul - microelement important pentru organismul uman și animal

Seleniul este unul dintre microelementele absolut necesare pentru dezvoltarea normală a oricărui organism viu [48, 61, 79, 93, 134]. Acest microelement are un rol important în multe

processe metabolice, iar deficitul lui poate provoca disfuncții metabolice severe [28, 202, 245, 264, 276]. Seleniul este parte componentă a majorității hormonilor și enzimelor, reglează reacțiile de oxido-reducere, influențează metabolismul proteic (în special, metabolismul aminoacizilor ce conțin sulf), activează procesele de respirație tisulară, influențează funcția imună a organismului. Rolul seleniului în organism este asociat, în primul rând, cu includerea lui în componența glutathionperoxidazei - uneia dintre enzimele antioxidante principale [46, 50, 52, 85, 127, 176, 213, 283, 296].

Seleniul este parte componentă a mai mult de 25 compuși biologic activi prezenți în organismul uman și cel animal [133, 234]. El este inclus în centrele active ale enzimelor din sistemul de protecție antiradicalică și antioxidantă, precum și celor participante în metabolismul acizilor nucleici, lipidelor, hormonilor (iodotironin-deiodinaza, tioredoxinreductaza, fosfoselenofosfataza, fosfolipid-hidroperoxid-glutathionperoxidaza, proteinele specifice P și W ș. a.), participă în detoxifierea de xenobiotice, reglează funcția glandei tiroide și a pancreasului, manifestă proprietăți hepatoprotectoare, stimulează protecția antitoxică, posedă acțiune radioprotectoare [257, 287, 328, 332].

Seleniul influențează pozitiv asupra sistemului reproductiv, participând în procesul de implantare a embrionului, dezvoltarea placentei, ameliorarea fertilității prin intermediul creșterii mobilității spermatozoizilor, sinteza testosteronului și spermei [176]. De asemenea, încetinește procesul de îmbătrânire, diminuează simptomele care apar în menopauză [30, 284]. Sunt cunoscute și alte proprietăți ale seleniului, precum cea antivirală, antimicrobiană, anticancer [83, 88, 107, 113, 125, 136, 142, 187, 238, 270, 283, 328].

Ca element chimic, seleniul a fost decoperit încă în 1817 (de către chimistul suedez J.J. Berzelius) și foarte mult timp a fost privit ca un component toxic al alimentelor, fiind declarate numeroase cazuri de intoxicare cu seleniu și cu compușii săi [218, 250]. Rolul de microelement al seleniului a fost demonstrat abia în a. 1957, când a fost stabilit că carența lui în hrana animalelor duce la dezvoltarea miodistrofiei, cardiomiopatiei și cirozei hepatice [222].

Carența alimentară pronunțată a seleniului este caracteristică pentru raioanele endemice și se manifestă sub formă de boala Keshan (afectarea inimii, rinichilor, mușchilor scheletali) și boala Kashin-Beck (afectează oasele și articulațiile, apare preponderent la copii și adolescenți) [62, 272, 279].

Cercetările au evoluat cu determinarea rolului seleniului în calitate de element esențial pentru organismul uman și cel animal, funcția principală a căruia fiind constatată cea de distrugere a hidroperoxidilor și peroxidilor lipidici, protejând organismul de stresul oxidativ [327].

Seleniul face parte din grupul celor 7 elemente (Fe, Ca, Mg, I, Se, Zn, Cu), deficitul cărora la populația planetei este cel mai frecvent [266]. Surse de seleniu pentru organismul uman sunt produsele de origine vegetală și animală, iar asigurarea cu cantitatea necesară de acest microelement depinde de condițiile geochimice ale habitatului [133]. Populația regiunilor cu deficit de seleniu în sol și apă este supusă unui risc mai mare de afecțiuni cardio-vasculare și oncologice [198, 226].

Printre țările cu deficit de seleniu în sol sunt China, Suedia, Finlanda, Rusia. Într-un șir de țări ale Europei de Vest, China și SUA sunt aprobate programe de stat care stimulează producerea de suplimente alimentare pentru animale și oameni, ce conțin seleniul. Totodată, îngrășămintele ce conțin seleniu sunt utilizate în Finlanda, Noua Zelandă, China și SUA pentru a obține cantități sporite de acest microelement în lanțul alimentar nemijlocit în nutrețuri ca o alternativă suplimentelor cu seleniu [26, 134, 239, 318, 326].

În Republica Moldova, seleniul se conține într-o cantitate relativ mare în apele naturale, ceea ce ar presupune o pondere semnificativ înaltă a formelor biodisponibile ale lui [311-312]. Conform rezultatelor unor studii [299, 315] pentru toate tipurile de sol de pe teritoriul interfluviului Nistru - Prut s-au determinat concentrații optime de seleniu. Diapazonul oscilațiilor conținutului de microelement în diferite tipuri de sol este destul de larg și constituie de la 100 la 668 $\mu\text{g/kg}$, ceea ce corespunde modificării valorilor de concentrație de la optime la selenodeficitare. Arealuri cu deficit de seleniu au fost identificate pentru solul de pădure cenușiu (118 $\mu\text{g/kg}$) și cernoziomul carbonat (100 $\mu\text{g/kg}$). O cantitate de seleniu la limita deficitară a fost determinată în probele de cernoziom cenușiu închis forestier (152 $\mu\text{g/kg}$), xerofit forestier (165 $\mu\text{g/kg}$), obișnuit (150 $\mu\text{g/kg}$) și de luncă (153 $\mu\text{g/kg}$) [299, 313].

Conținutul seleniului în culturile agricole se modifică în limite destul de largi - de la 78 la 166 $\mu\text{g/kg}$ în funcție de condițiile geochimice, însă o corelație între cantitatea de seleniu din sol și acumularea lui în plante nu a fost găsită. Un deficit al acestui microelement în sânge a fost determinat la 10% din populația regiunii transnistrene, la 25% conținutul seleniului a fost aproape de cel optimal, iar la 63% din populație, nivelul seleniului în sânge a fost stabilit la limite puțin mai înalte decât nivelul optimal [312].

Formele „naturale” (din surse vegetale) ale seleniului pentru organismul uman și cel animal sunt aminoacizii ce conțin seleniu – selenometionina (Se-Met) și selenocisteina (Se-Cys) [102, 163]. În cazul unui deficit alimentar de seleniu, în calitate de surse „artificiale” ale acestui microelement sunt acceptați selenitul și selenatul de sodiu, dar și unii compuși organici de origine microbiană. Ambele forme, atât cea anorganică, cât și cea organică se absorb rapid în

tractul gastro-intestinal, însă metabolismul lor ulterior în organism parcurge căi diferite [163, 204].

Asimilarea formelor organice ale seleniului este extinsă în timp, ceea ce contribuie la crearea unui depozit al lui în plasma sanguină. Formele anorganice sunt acceptabile în cazul, când este necesară corecția rapidă și în termeni restrânși a deficitului de seleniu, spre exemplu pentru restabilirea activității glutathionperoxidazei [303]. Anionii selenat SeO_4^{2-} și selenit SeO_3^{2-} se reduc rapid în organism până la anionul HSe^- - proces enzimatic în care în calitate de cofactor necesar intervine glutathionul redus (GSH). O parte din hidrogen seleniul (selenura de hidrogen) format se leagă cu selenoproteinele și proteinele de transport prin legături covalente sau Van-der-Waals, formând un „pool” metabolic labil al seleniului [68, 131, 241]. Cantitățile excesive de hidrogen seleniu se supun unei metilări lente cu formarea consecutivă a metil- hidrogen-seleniului, dimetil-seleniului și trimetil-seleniului care se excretă din organism cu urina, iar dimetil-seleniul în cantități mari și cu transpirația. Este de menționat, că hidrogen seleniul provenit din sursele de seleniu anorganic, acumulându-se în exces în țesuturi devine un compus foarte toxic [84].

În figura 1.1 sunt generalizate căile metabolice ale seleniului în organismul uman [84].

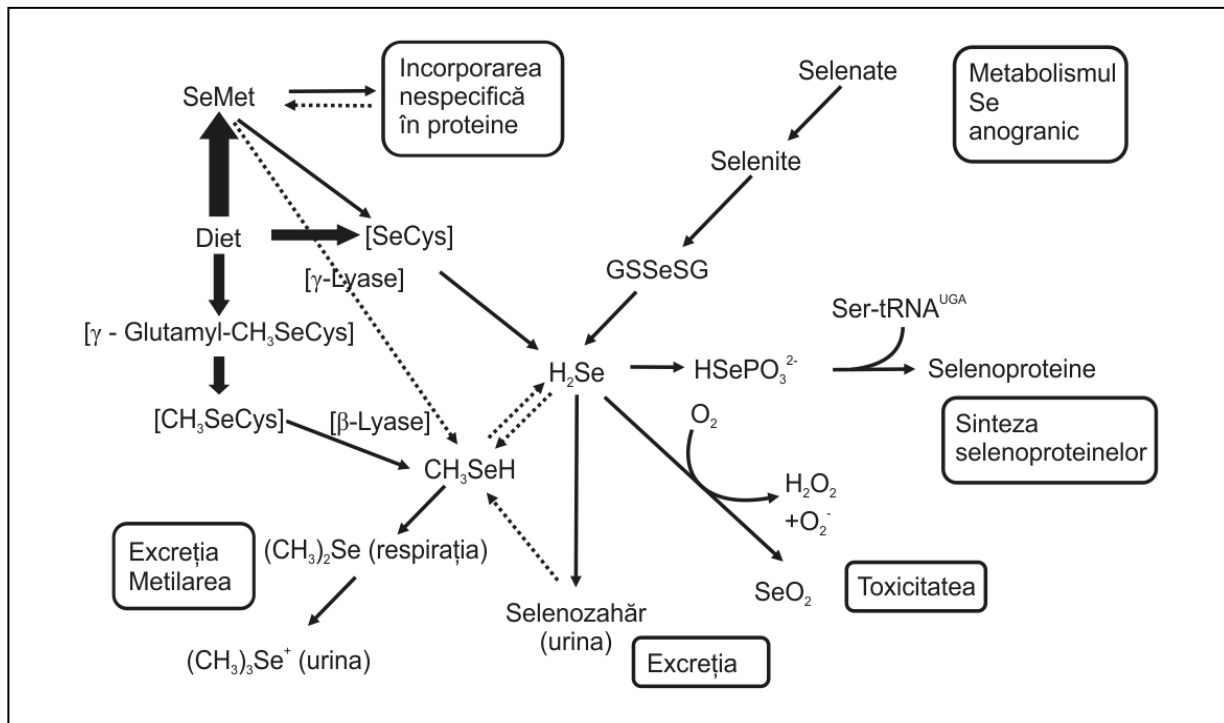


Fig. 1.1. Schema generalizată a metabolismului compușilor seleniului în organismul uman [84]

Spre deosebire de organismul uman (animal), plantele sunt capabile să sintetizeze diverși analogi ce conțin seleniu, similar aminoacizilor ce conțin sulf, inclusiv selenometionina – Se-Met. La utilizarea în hrană a selenoproteinelor, Se-Met se absoarbe și se asimilează de către organism [52, 84, 106]. Din cauza similitudinii între proprietățile fizico-chimice ale Met și Se-Met, aceasta din urmă este capabilă să o substituie pe prima din proteine, incluzându-se după mecanismul de translare specifică Met [204]. S-a demonstrat experimental, că după introducerea intravenos sau peroral a ^{75}Se -Met la animale, aceasta se include într-o cantitate mare de proteine cu mase moleculare diferite atât în plasmă și eritrocite, cât și în diferite țesuturi [106]. Includerea nespecifică a Se-Met în proteine posedă două particularități distincte. Prima – la includere nu se respectă o careva stehiometrie. Mai mult seleniu se include în proteinele în care există mai multe resturi de Met și Cys (cisteina) în structura lor primară. Cea de a doua particularitate este, că cantitatea de Se-Met inclusă (și retenția seleniului în țesuturi, îndeosebi în mușchi) depinde foarte puternic nu numai de cantitatea de Se-Met care pătrunde cu hrana, dar și de cantitatea de Met în aceasta [51, 144, 188].

Procese de includere a Se-Met în proteinele tisulare și eliberarea ei din acestea în cadrul proteolizei sunt lente. Se-Met eliberată din proteine se metabolizează. O parte se supune transaminării cu formarea alaninei și metil-hidrogen-seleniului care apoi sau se metilează și se excretă, sau se supune demetilării până la selenura de hidrogen care se include în „pool - ul” labil al seleniului din organism [163].

O altă cale metabolică, este procesul de transsulfurare cu formarea Se-Cys. Apoi, Se-Cys se include nespecific în proteinele tisulare substituind Cys. O parte din Cys se supune deselenizării cu formarea sau a selenitului, sau a selenurii de hidrogen sub acțiunea selenocisteină-liazei dependentă de vitamina B6, cu formarea intermediară a seleniului zero valent. Includerea Se-Cys în proteinele tisulare depinde de asigurarea organismului cu seleniu [44, 69, 197, 241].

Astfel, sinteza căilor metabolice prezentată mai sus, oferă explicații asupra diferențelor în ceea ce privește biodisponibilitatea pentru organism a formelor organice și anorganice ale seleniului. Administrat prin alimente în doze fiziologice (0,1 - 0,3 mg/kg rație alimentară) și în condițiile unei cantități suficiente de sulf, eficiența Se-Met, selenitului și selenatului ca surse pentru sinteza glutathionperoxidazei este aceeași. Dacă nivelul de consum al seleniului este scăzut (mai puțin de 0,05 mg/kg) și neadecvat cerințelor fiziologice crescute (ca de exemplu în timpul gravidității și lactației), sau organismul este insuficient asigurat cu metionină, eficiența unor suplimente anorganice ale seleniului este mai mare decât în cazul utilizării Se-Met. Acest fenomen este cauzat de faptul că Se-Met în aceste condiții fiziologice se include în proteinele

tisulare, și din poziția sintezei glutathionperoxidazei, se utilizează „nu după destinație” [106, 163]. Totuși, toxicitatea Se-Met (seleniului organic) este considerată mult mai scăzută, decât a seleniului anorganic (selenat sau selenit) și prezintă un risc scăzut de supradozare. Astfel, Se-Met și selenoproteinele din plante reprezintă formele preferențiale de asigurare a organismului cu seleniu în scopuri profilactice [204, 265].

Concentrația „fiziologică” de seleniu în organismul uman, constituie 10 - 14 mg, dintre care cantitatea de seleniu în „pool - ul” metabolic labil (proteinele Se specifice + selenit + selenura de hidrogen ș. a. derivate ale lui) constituie 3,5 - 6,5 mg. Restul seleniului sub formă de Se-Met și Se-Cys se conține în proteinele tisulare [84, 132]. Este clar, că supraconținutul sau deficitul de seleniu provoacă un dezechilibru al proceselor metabolice în care este implicat acest microelement. Diferența dintre doza optimală și cea toxică este foarte mică [88, 133].

Doza zilnică recomandată pentru seleniu este diferită și depinde de regiunea geografică. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) recomandă o doză zilnică pentru seleniu de 55 μg pentru un matur, indiferent de sex [240, 267]. În SUA, Consiliul pentru Alimente și Nutriție a stabilit doza zilnică recomandată de seleniu: pentru bărbați – 40 - 70 μg, pentru femei – 45 - 55 μg și de 25 μg pentru copii [133]. În Marea Britanie doza zilnică recomandată de seleniu este de 60 μg pentru femei și de 75 μg pentru bărbați și poate fi mărită până la 100 μg seleniu/zi [297]. În R. Moldova, doza zilnică recomandată de seleniu este de 55 μg/zi, iar cea maximală este de 100 μg/zi [8].

Biodisponibilitatea seleniului din produsele alimentare depinde de un șir de factori, aceasta crește, spre exemplu, în prezența unor compuși astfel ca vitaminele A, D și E, dar depinde și de conținutul de proteine, lipide, sau metale grele [88, 134]. S-a stabilit, că produsele bogate în proteină conțin niveluri mai înalte de seleniu, decât plantele ce conțin mai puțină proteină, ceea ce se datorează faptului, că proteinele sunt compuși biologic activi care acumulează cel mai mult acest microelement. Excepție prezintă, spre exemplu, unele reprezentante ale fam. *Brassicaceae* (varza, hreanul, rapița) considerate hiperacumulatori ai seleniului [78, 134].

Sursele principale de seleniu pentru organismul uman sunt produsele din carne (31%), pește (19%), pâinea și cerealele (11%). Produsele cu cel mai scăzut conținut de seleniu sunt laptele și produsele lactate (de la 0,005 la 0,018 mg/kg produs), legumele și fructele. Deși în cereale se conține puțin seleniu, datorită particularităților consumului uman, acestea pot fi considerate furnizorii de bază de microelement, mai ales dacă ele au crescut pe soluri bogate în seleniu. Forma principală a seleniului în cereale este Se-Met, care conform ultimelor date se concentrează în embrion [67, 88, 261].

În ultimele decenii, se precaută în continuare compuși noi ce conțin seleniu, pentru a fi introduși în compoziția produselor alimentare, fie sub forma unor suplimente și preparate biologic active combinate cu seleniu în calitate de componentă a dietelor persoanelor sănătoase sau bolnavilor în scopuri preventive și/sau de tratament, fie în calitate de remedii, sau stimulative, sau corectoare [22, 26, 133, 189, 204 - 205, 248].

Printre primii compuși cu absorbție rapidă utilizați pentru a suplini deficitul de seleniu în organism a fost selenitul de sodiu [326]. Vom menționa că aceștia au evoluat în timp, astfel încât la momentul actual sunt disponibile o varietate de preparate ce conțin seleniul în diferite forme. În tabelul 1.1 sunt expuse unele exemple de produse ce conțin seleniul, forma microelementului din produs și prețul estimativ. După natura seleniului, preparatele pot grupate astfel, în următoarele categorii:

1) preparate în care sursa de seleniu este selenitul sau selenatul de sodiu (exm.: *Hefe-Selen*, Allpharm Vertriebs GmbH; *SEL 100*, MEDVITAL Concept GmbH, GALL PHARMA *Selen*, Hecht-Pharma GmbH; *Uniselen*, Kohler Pharma GmbH, *Selen-Loges*, Dr. Loges+Co. GmbH; *CEFASEL* Cefak; *SELEN*, EuroNutrador B.V. - Germania), sau unul dintre acești compuși în combinație cu vitamine (exm.: *Multi-Tabs Active*, FERROSAN, Danemarca; *Symbion*, MERCK, Germania; *SelzincPlus*, Pro.-Med CS Praha Cehia; *Centrum*, Pfizer consume Manufacturing, Italia; *Xenosulf*, Laboratories LeStum, Franța).

2) preparate ce conțin seleniul organic: pe bază de metilselenocisteină (exm.: *Selenium Sinergy*, Jarrow Formulas, SUA), selenometionină (exm.: *SeMet*, AOR, SUA; *Pure encapsulations Selen*, Pro Medico, Germania), L-selenometionină (exm.: *Selenkor*, Vitafarm – COM, R. Moldova; *Selenium*, Nature's Way, SUA; *Selenmethionine*, Thorne Research, SUA; *Selenium*, Swanson, USA; *Selenium*, California Gold Nutrition, SUA), L-selenometionină în combinație cu vitamine (exm.: *Selenium+A, C, E*, Hooland Barret, Marea Britanie, *Full Spectrum Minerals Caps*, Now, SUA; *Bio E + Selenium*, Solaray, USA), sau și alte astfel de combinații ca: *SuperSelenium Complex* (L-selenometionină, selenit de sodiu, Se-Metil-L-Selenocisteină), Life Extension, SUA; *Selenium* (Complex de glicinat de seleniu), FutureBiotics, SUA; *Selenium Activ* (Selexen H – C₁₉H₂₂Se (9-fenil - octahidroselenoxanten), DIOD, Rusia.

3) preparate pe bază de complexe naturale combinate cu seleniul: drojdii seleniate și/sau seleniu legat organic (exm.: *SelenoExcell Selenium*, Natural Factors, Canada; *Selenium*, Scitec Nutrition, Ungaria; *Selenium*, MegaFood, SUA; *Selenium*, Nature's Bounty, SUA; *Selenium*, 21st Century, USA; *Selen 200 naturlich*, NaturaFit GmbH, Germania; *SelenoPrecise* și *SelenQ10*, PharmaNord, Danemarca; *Selenium*, Healthspan, Marea Britanie) drojdii, seleniu și vitamine (*Selenium Forte*, IVES PONROY, Franța), spirulina și seleniu (exm.: *Spirulina-Soci-Selen*, Agro

Victoria, Rusia, *Selen mse*, MSE Pharmazeutika GmbH, Germania *Selenium+Spirulina*, PaleoLf, Spania); spirulina îmbogățită cu seleniu (exm.: *Selenium Spirulina*, Far East Bio Tec Co, Taiwan; *Selenium Spirulina A+*, Febico, România), spirulina ce conține seleniu legat organic (exm.: *Selenium Spirulina*, Life Light, Germania; *SpiruSelen*, Sanatur, Germania), sau o combinație între *Spirulina platensis*, drojdie seleniată și extract de *Helianthus tuberosus* – *Se-Spirulin*, Hofigal, România.

Tabelul 1.1. Unele exemple de produse ce conțin seleniul, forma microelementului din produs și prețul estimativ

Denumire produs	Nr. caps/ compr.	Conț. seleniului, µg/caps. /compr.	Forma seleniului în produs	Producător	Prețul
Preparate pe bază de seleniu anorganic					
<i>Hefe – Selen</i>	90	30	Na ₂ SeO ₃	Allpharm Vertriebs GmbH, Germania	21,5\$+
<i>SEL 100</i>	100	100	Na ₂ SeO ₃	MEDIVITAL Concept GmbH, Germania	40,75\$+
<i>GALL PHARMA Selen</i>	360	200	Na ₂ SeO ₃	Hecht-Pharma GmbH, Germania	298,2\$+
<i>Uniselen</i>	100	100	Na ₂ SeO ₃	Kohler Pharma GmbH, Germania	43\$+
<i>SELEN</i>	90	200	Na ₂ SeO ₃	Euro Nutrador B.V., Germania	98,3\$+
<i>Multi-Tabs Active</i>	60	50	Na ₂ SeO ₄	FERROSAN, Danemarca	16\$
<i>Symbion</i>	90	60	Na ₂ SeO ₄	Merck Selbstmedikation GmbH, Germania	80,6\$+
<i>Selzinc Plus</i>	30	40-60	Na ₂ SeO ₃	Pro.-Med. CS Praha, Republica Cehă	7\$
<i>Centrum</i>	30	25	Na ₂ SeO ₄	Pfizer consumer Manufacturing, Italia	12,45\$+
<i>CEFASEL</i>	60	100	Na ₂ SeO ₃	Cefak, Germania	31\$
<i>Selen-Loges</i>	200	200	Na ₂ SeO ₃	Dr. Loges + Co. GmbH, Germania	106,8\$+
<i>Xenosulf</i>	80	22.5	Na ₂ SeO ₃	Laboratoires Le Stum, Franța	33,4\$
Preparate ce conțin seleniul organic					
<i>Selenium Synergy</i>	60	200	Methyl-Se-Cys	Jarrow Formulas, USA	8,53\$
<i>SeMet</i>	90	55	Se-Met	AOR, USA	18,97\$
<i>Pure encapsulations Selen</i>	180	200	Se-Met	Pro Medico GmbH, Germania	107,5\$+
<i>Selenkor</i>	30	55	L-Se-Met	VITAPHARM-COM, R. Moldova	6,7\$ (110MDL)
<i>Selenium</i>	100	200	L-Se-Met	Nature's Way, USA	11,49\$
<i>Selenomethionine</i>	60	200	L-Se-Met	Thorne Research, USA	10,00\$+
<i>Selenium</i>	300	100	L-Se-Met	Swanson, USA	13,5\$+

Continuare **Tabel 1.1.** Unele exemple de produse ce conțin seleniul, forma microelementului din produs și prețul estimativ

<i>Selenium</i>	180	200	L-Se-Met	California Gold Nutrition, USA	11,00\$
<i>Bio E + Selenium</i>	60	100	L-Se-Met	Solaray, USA	18,31\$+
<i>Selenium + vit. A, C și E</i>	90	100	L-Se-Met	Holland & Barret, UK	13,3\$+
<i>Full Spectrum Minerals Caps</i>	240	50	L-Se-Met	Now, USA	17,26\$+
<i>Super Selenium</i>	100	200	L-Se-Met+ Selenit +Se-Methyl-L-Se-Cys	Life Extension, USA	10,50\$
<i>Selenium</i>	100	200	Complex de glicinat de seleniu	FutureBiotics, USA	10,7\$+
<i>Selenium-Activ</i>	30	50	Selexen C ₁₉ H ₂₂ Se (9-fenil-octahidroselenoxanten	DIOD, Rusia	4,2\$
Preparate ce conțin seleniu din surse naturale și/sau combinate cu seleniul					
<i>SelenoExcell, Selenium</i>	90	200	Drojdie/Seleniu legat organic	Natural Factors, Canada	7,82\$
<i>Selenium</i>	100	50	Drojdie seleniată	Scitec Nutrition, Ungaria	11\$
<i>Selenium</i>	60	100	Drojdie/Seleniu legat organic	MegaFood, SUA	20,85\$+
<i>Selenium</i>	100	200	Drojdie seleniată	Nature's Bounty, SUA	7,18\$+
<i>Selenium</i>	60	200	Drojdie seleniată	21st Century, USA	4,9\$+
<i>Selen 200 naturlich</i>	90	200	Drojdie seleniată	NaturaFit GmbH, Germania	34,7\$
<i>SelenoPrecise</i>	60	100	Drojdie seleniată	Pharma Nord, Danemarca	20\$+
<i>SelenoQ10</i>	120	200	Drojdie seleniată	Pharma Nord, Danemarca	60\$+
<i>Selenium</i>	240	200	Drojdie seleniată	Healthspan, Marea Britanie	16,10\$+
<i>Selenium Forte</i>	40	25	Drojdie seleniată	YVES PONROY, Franța	16,40\$+
<i>Spirulina-Soci-Selen</i>	60	15	Drojdie seleniată	Agro-Victoria, Rusia	7\$+
<i>Selen mse</i>	120	50	Spirulina și seleniu	MSE Pharmazeutika GmbH, Germania	46,7\$+
<i>SELENIUM + SPIRULINA</i>	60	200	Spirulina și seleniu	PaleoLf, Spania	19,00\$+
<i>Selenium Spirulina</i>	150	30	Spirulina îmbogățită cu seleniu	Far East Bio Tec Co, Ltd, Taiwan	127\$+
<i>Selenium Spirulina A+</i>	180	37.5	Spirulină îmbogățită cu seleniu	Febico, Romania	57\$+
<i>Selenium Spirulina</i>	90	76.8	Seleniu legat organic	Life Light, Germania	23\$
<i>SpiruSelen</i>	250	30	Seleniu legat organic	Sanatur, Germania	46\$+
<i>Se – Spirulin</i>		15	<i>Spirulina platensis</i> +drojdie seleniată + extract de <i>Helianthus tuberosus</i>	Hofigal, România	3,6\$

Notă: + - plus costul livrării.

Astfel, o parte dintre aceste produse conțin selenitul sau selenatul de sodiu, sau selenometionina, selenocisteina, glicinatul de seleniu în calitate de seleniu organic, sau sursa de seleniu legat organic sunt drojdiile și spirulina (masa uscată de aceste microorganisme ce conține seleniu, sau în puținele cazuri, biomasa care se obține prin cultivarea lor în prezența concentrațiilor mari de selenit de sodiu) [302].

Drojdiile alimentare fabricate în prezent la nivel industrial au un sinecost relativ mic, datorită cărui fapt sunt foarte atractive și de perspectivă în calitate de sursă alimentară de seleniu organic. Utilizarea însă, în masă a drojdiilor are unele dezavantaje, printre care principalul este efectul sensibilizant al lor. În al doilea rând, utilizarea drojdiilor ca atare în produsele dietetice poate influența negativ asupra proprietăților organoleptice ale acestor produse [326]. Totodată, nu totdeauna este clară calea pe care a fost obținut seleniul organic: cel mai frecvent, drojdiile sunt „îmbogățite cu seleniu”, prin adăugarea lui la drojdiile uscate [302]. La fel, și în cazul spirulinei - în cele mai dese cazuri, seleniul este adăugat la pulberea uscată. În afară de aceasta, în aceste produse nu este indicat raportul dintre forma organică și anorganică a seleniului. În același timp, în cazul introducerii „artificiale” a seleniului există riscul supradozării, care poate duce la creșterea toxicității suplimentelor alimentare și preparatelor ce conțin acest microelement [25, 164].

1.2 Proprietățile biologice distincte ale germaniului

Germaniul nu a fost considerat niciodată microelement esențial pentru organismele vii. Totuși, germaniul nu este mai puțin important pentru organismul uman și animal, datorită proprietăților sale biologice și deci, a efectelor terapeutice pozitive manifestate asupra acestora. Printre principalele sale proprietăți este cea similară hemoglobinei (caracteristică germaniului organic). Germaniul participă în procesul de transport al oxigenului în țesuturile organismului și astfel, preîntâmpină instalarea unei stări de hipoxie în țesuturi. Germaniul posedă și proprietăți antioxidante pronunțate, care se manifestă prin blocarea radicalilor liberi în organism; influențează pozitiv asupra stării sistemului imunitar al organismului – inhibă multiplicarea celulelor microbiene prin activarea macrofagelor; posedă proprietăți antifungice, antivirale și antibacteriene; întârzie dezvoltarea neoplasmelor maligne și previne apariția metastazelor; reglează peristaltica și sistemul de valve a sistemului digestiv și cel venos; reduce duritatea (compușii germaniului blochează fluxul de electroni în celulele nervoase) și acumularea de metale grele în organism [31, 72, 119, 152, 174, 178, 224, 244, 282, 286, 288, 316].

Majoritatea studiilor cu referire la acțiunea germaniului, prezintă atât efectele lui pozitive (la utilizarea în doze precise în calitate de medicament) [31, 194, 224, 228, 246, 260], cât și cele negative asupra organismului (la administrarea incorectă a preparatelor ce conțin germaniu) [161, 277].

Efectele benefice sunt caracteristice germaniului organic, iar cele negative - toxicității înalte a formei sale anorganice [211]. La administrarea perorală, germaniul se absoarbe rapid și intensiv din tractul gastro-intestinal, după care se distribuie uniform în eritrocite și plasmă, și se transportă către diferite organe și țesuturi sub formă liberă [90, 130, 256]. Acumularea și depozitarea germaniului în organe, la fel depinde de forma lui chimică. Germaniul anorganic are tendință de a se acumula în organism, cele mai înalte concentrații fiind determinate în ficat, splină, tractul gastro-intestinal și țesutul osos. Forma organică a germaniului nu se acumulează, eliminându-se din organism fără a fi supusă unor schimbări metabolice [90]. Administrarea de durată a germaniului, în special a formei sale anorganice, duce la efecte adverse severe, inclusiv diverse disfuncții ale organelor (inclusiv miopatie, anemie, neuropatie periferică, dereglări ireversibile ale funcției renale ș. a.), provocând în unele cazuri, chiar decesul [77, 192, 277].

Germaniul organic (prin proprietățile similare hemoglobinei) previne dezvoltarea așa numitei stări de „hipoxie sanguină” care survine în cazul diminuării nivelului de saturație cu oxigen a sângelui, determinată în caz de hemoragii, intoxicații cu monoxid de carbon și radiație. Sensibilitate sporită față de germaniu manifestă: sistemul nervos central, inima, țesutul renal și cel hepatic [139, 152].

Efectele antivirale, anticancer, radioprotectoare și cele imunomodulatoare ale germaniului organic se datorează capacității lui de a stimula producerea de interferon de către celulele T. Stimularea răspunsului imun celular reprezintă una dintre cele mai distincte caracteristici ale germaniului organic, de rând cu capacitatea de a contribui la saturația cu oxigen și proprietățile sale antioxidante, explicând efectul lui pozitiv în reabilitarea stării de sănătate în diferite afecțiuni [31, 60, 117, 145, 178, 193, 258 - 259].

Funcționarea normală a tuturor sistemelor organismului este garantată de transportul și saturația cu oxigen a țesuturilor. Țesuturile patologice și țesuturile cu semne incipiente de afectare totdeauna se caracterizează prin insuficiență de O_2 și prezența H^+ . Germaniul organic (sub formă de sescvioxid) posedă capacitatea pronunțată de a transporta O_2 în oricare punct al organismului și a asigura interacțiunea lui cu H^+ . La baza acțiunii germaniului organic la interacțiunea lui cu H^+ este reacția de deshidratare (eliminarea hidrogenului din compuși organici), iar oxigenul care participă în această reacție poate fi comparat cu un „aspirator” care purifică organismul de ioni încărcăți pozitiv ai hidrogenului [242 - 243].

Studiile asupra proprietăților germaniului organic au debutat în 1967, când cercetătorul japonez K. Asai a sintetizat sescvioxidul de bis-carboxietil germaniu (*bis-carboxyethyl germanium sesquioxide*), cunoscut sub denumirea uzuală de Ge-Oxi-132 sau Ge-132. Pentru Ge-132, dar și pentru alți compuși organici ai germaniului, ca de exemplu sescvioxidul de 1-fenil-2-carbamiletel germaniu (*1-phenil-2-carbamilethyl germanium sesquioxide*) și sescvisulfidul de 1-fenil-2-carbamiletel germaniu (*1-phenyl-2-carbamilethyl germanium sequisulfide*), s-a demonstrat ulterior, capacitatea de a reține dezvoltarea unor tumori canceroase sau de a împiedica apariția unor metastaze. Efectele pozitive ale acestor compuși sunt clarificate în caz de leucemie, formele de cancer: mamar, pulmonar, de prostată, de col uterin, ovarian [31, 174, 194, 214-215, 228, 244, 260].

Germaniul (organic) poate preveni acumularea de metale grele, proprietate datorată structurii sale unice - structură cubică cu trei ioni negativi de oxigen în jurul germaniului. Ionii negativi de oxigen sunt situați la baza triunghiului cubic, iar două triunghiuri cubice formează o moleculă. Orice metal greu acumulat în organism se află în starea de ioni pozitivi care pot fi captați de ionii încărcăți negativ de oxigen ai germaniului organic [31].

Suplimentele alimentare ce conțin germaniu organic au început să fie utilizate pentru prima dată în anii 70 ai sec XX în Japonia, apoi și în alte țări, iar testarea lor experimentală a confirmat efectele pozitive ale lor asupra organismului uman și celui animal [135, 145, 152, 224, 228, 244, 246, 258, 260].

Efecte terapeutice benefice ale germaniului organic au fost documentate experimental sau clinic în: tratamentul artritei reumatoide și reumatismului, leucemiei, dereglărilor psihice, SIDA, bolilor cardiace (inclusiv maladia Reynaud și infarctul miocardic), astmului bronșic, diabetului, malariei, sclerozei, epilepsiei, hepatitei B ș. a. [140, 178, 203, 298].

De rând cu acești compuși organici ai germaniului acțiunea cărora a fost elucidată, o altă formă cunoscută a germaniului organic este lactat-citrat-germanatul de potasiu sau Sanumgerman, produs de firma Sanum-Kehlbeck (Germania). Este unul dintre cei mai extensiv utilizați compuși ai germaniului organic în decursul ultimilor 10 ani în Europa, iar efectele lui pozitive sunt comparabile cu cele ale Ge-132. Spirogermanium este un alt compus metaloorganic sintetic care conține germaniu cu azaspiran și posedă activitate antiproliferativă, utilizarea căruia este însă, limitată, datorită riscului ridicat de neurotoxicitate [190, 282, 298].

Este cunoscut și preparatul „Bio-Germanium” (obținut la cultivarea drojdiilor) fabricat de către firma GerantiPharm și care se poziționează în calitate de produs imunostimulator și anticancer [65, 121, 149, 182].

Germaniul are un areal de răspândire foarte larg și poate fi găsit, deși în cantități foarte mici, pretutindeni pe mapamond: ape naturale, cărbune de pământ, alge, licheni, ciuperci tubulare, plante ș. a. [235]. Spre exemplu, cantitatea de germaniu în plante (considerate o sursă de germaniu organic), variază în funcție de calitatea solului pe care acestea cresc [268]. Circa 0,02 - 0,07% de acest microelement se conțin în ginseng, frunzele de ceai, aloe, bambus, usturoi ș. a. [292, 317]. Forma germaniului organic din materia vegetală este cea de sescvioxid de carboxietil [157]. În prezent sunt sintetizați compuși organici ai germaniului – sescvioxizii (*sesquioxides*) cu fragment pirimidinic. Acești compuși sunt apropiați după structură de compuși naturali ai germaniului, care se conțin, spre exemplu, în rădăcina de ginseng.

Doza zilnică recomandată pentru germaniu (în formă organică) este de 0,4 - 3,4 mg. Cu alimentele se recomandă a se administra de la 0,4 la 1,5 mg. În majoritatea cazurilor, în plante și în organisme vii, atomii de germaniu sunt legați cu molecule organice și există sub formă de compuși germaniuorganici sau complexe cu o toxicitate scăzută și activitate biologică înaltă. Capacitatea de absorbție a germaniului de către organism la fel este una înaltă – la nivelul de 95%, cu o distribuție uniformă atât în spațiile intracelulare, cât și cele extracelulare [298]. S-a stabilit, (în rezultatul analizei a 125 tipuri de produse alimentare) că zilnic cu hrana organismului îi sunt furnizate în jur de 1,5 mg de germaniu.

Conținutul germaniului în diferite produse este foarte variat: de la 0,002 - 0,004 mg/kg (spre exemplu, în pește, carne, pâine ș. a.) până la 2 - 9 mg/kg (boboase, suc din tomate, usturoi, aloe vera, ceai verde, ș. a.) [140, 317]. Pentru a asigura cantitatea zilnică necesară de germaniu este necesar un consum mare de alimente, o sarcină ireală pentru organism din punct de vedere al potențialului său fizic și fiziologic.

Sursele alimentare de origine vegetală sau animală conțin compuși organici, precum Ge-132, amestec de sescvioxid de carboxietil germaniu (*sesquioxide de carboxyethyl germanium*) și sescvisulfid de 1-fenil-2-carboxietilgermaniu (*1-phenyl-2-carboxyethyl germanium sesquisulfide*), sanumgerman (*lactate-citrate-germanium*), spirogermanium (*2-aza-8-german-spirodcane-2-propamine-8,8-diethyl-N,Ndimethylidichloride*) [77, 127].

În tabelul 1.2 sunt aduse câteva exemple de preparate germaniucumponente, din care se poate observa, că majoritatea dintre aceste preparate conțin formele (compușii organici ai germaniului: sescvioxid de germaniu, sescvioxid de bis-carboxietil germanium, sescvioxid de bis-2-carboxietil germaniu) descrise mai sus.

În același timp, de către producători se fac încercări de a realiza diferite combinații ale germaniului organic, ca spre exemplu cu alte microelemente – *Seleherz*, VMIN Rusia, sau complexe constituite din drojdie biogermanică combinată cu vitamine (A, B1, B2, B6, B12, C,

D, E, K), macro- (Mn, Ca) și microelemente (Fe), aminoacizi (lizina, metionina, acidul asparagic) (Geranti Co. Ltd, South Korea).

Tabelul 1.2. Unele exemple de preparate germaniucumponente

Denumire produs	Nr caps/ compr.	Cant. de germaniu mg/caps. /compr.	Sursa de germaniu organic în preparat	Producător	Prețul
<i>Ge ProCoQ10 Max</i>	30	50	sesquioxid de germaniu	Zortho, SUA	55,95\$+
<i>Organic Germanium</i>	60	200	sesquioxid de germaniu	Body as Doctor, SUA	71\$
<i>Organic Germanium</i>	50	150	sesquioxid de bis-carboxietil germaniu	NutriCology, SUA	59,25\$+
<i>Germanium Organic</i>	30	150	sesquioxid de bis-carboxietil germaniu	Douglas Laboratories, SUA	62,10\$
<i>Organic Germanium</i>	50	150	sesquioxid de bis-carboxietil germaniu	Allergy Research Group, SUA	62,2\$
<i>Organic Germanium +</i>	60	150	sesquioxid de bis-2-carboxietil germaniu	Konig laboratoriu, Canada	49,15\$+
<i>Organic Germanium</i>	60	100	GE-132	Chi's Enterprise Inc, SUA	55,2\$
<i>Organic Germanium Ge-132</i>	30	100	germaniu organic Ge-132	Super Smart, Franța	35,5\$+
<i>Power Organic Germanium</i>	60	125	germaniu organic	DHC, Japan	136\$+
<i>Ge-132</i>	60	100	sesquioxid de bis-beta-carboxietil germaniu	Jarrow Formulas, USA	50\$+
<i>Germanium Sesquioxide</i>	100	100	sesquioxid de bis-carboxietil germaniu	VIVA Life Science, USA	168\$+
<i>GeOxy-132</i>	120	250	GE-132	Noble Nutraceuticals, LLC, SUA	150\$
<i>Organo-Germanium Ge-132</i>	Pulbere 50g		Ge-132 pur, sesquioxid de germaniu	Allergy Research Group, SUA	213\$
<i>Drojdje biogermanică, complex de vit., amin. macro- și microelemente.</i>	240	400	Drojdje biogermanică	Geranti Co.,Ltd South Korea	899,9\$+
<i>Seleherz</i>	60	25/100	25,0 µg de Se org. 100 µg de Ge org.	VMIN, Rusia	13,5\$+

Notă: + - plus costul livrării.

Este de menționat, în același timp, că comparativ cu seleniul, preparatele ce conțin germaniu sunt mai puține și mult mai costisitoare, cel mai expensiv – complexul de drojdje

bioorganică de la Geranti Co. Ltd, Korea de Sud care costă circa 900\$, din cauza probabil, și a procesului costisitor de obținere a drojdiei bioorganice.

Materia vegetală și cea de origine animală care conține germaniu, este în continuare o sursă importantă de acest microelement rar, dar nu mai puțin important pentru organism. Suplimentele alimentare sunt atractive prin faptul, că compoziția lor poate asigura acea cantitate de germaniu zilnic necesară organismului.

Aici se poate menționa, că ambele forme ale germaniului, atât cea anorganică, cât și cea organică, pot fi incluse în compoziția suplimentelor, deși forma organică se utilizează mai mult, deoarece este mai puțin toxică și mai biodisponibilă [286]. Același lucru este valabil și pentru apele sintetice îmbogățite cu germaniu, dar și pentru produsele cosmetice ce conțin germaniu [31, 77, 129].

1.3 *Arthrospira platensis* (spirulina) – sursă de materii prime biologice active

Una dintre principalele surse de materii prime biologice active de origine naturală sunt obiectele biotehnologice, ale căror reprezentanți de valoare sunt tulpinile specializate de cianobacterii și microalge [81, 141, 147, 196, 230, 232].

Sub acest aspect, biomasa cianobacteriană și microalgală și componentele ei biologice active pot fi utilizate în profilaxia și tratarea diferitor patologii cauzate de disfuncțiile metabolice, precum și pentru a elimina consecințele expunerii organismului uman la substanțele toxice. Biomasa cianobacteriilor și microalgelor prezintă proprietăți farmacologice, datorită prezenței în componența sa a aminoacizilor liberi, oligopeptidelor, carotenoizilor, acizilor grași polinesaturați, vitaminelor, macro- și microelementelor, etc. [10, 66, 92, 100, 118, 137, 141, 191, 232].

În contextul creșterii, tot mai mult, a necesității substituirii aditivilor și suplimentelor chimice prin produse (preparate și suplimente) naturale, cianobacteriile și microalgele, grație componenței lor biochimice și capacității de acumulare și biotransformare a bioelementelor, inclusiv a seleniului și germaniului, reprezintă materiile prime oportune pentru a fi valorificate în acest scop.

În prezent, când proprietățile farmacologice ale mai multor biocomponente ale cianobacteriilor și microalgelor au devenit cunoscute, cercetătorii din întreaga comunitate științifică acordă o atenție sporită dezvoltării tehnologiilor de obținere a preparatelor și suplimentelor alimentare din biomasa cianobacteriilor și microalgelor. În unele cazuri, cianobacteriile și microalgele pot fi utilizate ca materie primă pentru prepararea acestor produse.

În altele, derivatele lor pot fi folosite ca aditivi alimentari care ameliorează calitatea finală a produselor de bază prin păstrarea sau ameliorarea structurii, gustului, aspectului și prelungirii termenului lor de valabilitate [38, 45, 53, 255].

Dintre cianobacteriile și microalgele cultivate la scară industrială în multe țări (Mexic, Brazilia, SUA, China, Egipt, Germania, Japonia, India, Rusia, Moldova, etc.) se remarcă cianobacteria *Arthrospira platensis* (spirulina), care ocupă o poziție de lider în ceea ce privește volumele obținute din produsele ei. Acest lucru se datorează, în primul rând, faptului că nu are perete celular și se asimilează ușor. Productivitatea spirulinei este mult mai mare decât cea a culturilor tradiționale, cum ar fi grâul, porumbul sau soia, în plus, se caracterizează printr-un ciclu scurt de cultivare [275, 321]. Nu este toxică, are un metabolism plastic, care poate fi dirijat de condițiile de cultivare, adică, prin variația acestora, este posibilă creșterea semnificativă a randamentului anumitor substanțe de interes: proteine, lipide, carbohidrați, aminoacizi, macro- și microelemente în formă biodisponibilă, pigmenți, etc. Acest fapt face posibil controlul biosintezei compușilor valoroși din punct de vedere biotehnologic [12, 162, 191].

Spirulina este o sursă de substanțe biologice active, bioelemente și este, de asemenea, o matrice convenabilă pentru încorporarea oligoelementelor [15, 58, 209]. O mare importanță revine posibilității de ajustare a compoziției chimice a mediilor nutritive, care permite efectuarea controlului proceselor de biosinteză în celulele cianobacteriene și asigurarea acumulării fie a proteinelor, fie a carbohidraților, sau a sintezei anumitor vitamine [12, 158, 162].

Din antioxidanți în componența biomasei *Arthrospira platensis* pot fi menționați carotenoizii, ficobiliproteinele, acizii grași nesaturați, tocoferolul, enzimele, polifenolii, mixoxantofile, etc. [10, 116, 155, 180]. Eficiența ridicată și popularitatea spirulinei se explică și prin capacitatea sa de a acumula cantități semnificative de proteine care conțin toți aminoacizii esențiali (până la 60 - 70%), C-ficocianină (până la 10 - 14%), clorofilă (până la 1%) și β -caroten (până la 1%) [27, 73, 112, 171].

Efectele biologice ale spirulinei și preparatelor derivate din aceasta sunt tot mai mult studiate, pentru a evalua posibilitatea cultivării pe scară largă și utilizarea ei în continuare în alimentație, precum și în scopuri profilactice, terapeutice ș. a. Numeroase publicații confirmă, de asemenea, siguranța utilizării în nutriție și farmaceutică a biomasei și preparatelor din spirulină [41, 91, 128, 169, 185, 227, 231, 269].

Biomasa de spirulină este valorificată în diferite ramuri ale activității umane: obținerea de proteine alimentare și hrană pentru om și animale de înaltă calitate, substanțe biologice active pentru domeniile alimentar, farmaceutic și cosmetic (coloranți, alimentari, enzime, vitamine, pigmenți, lipide, carbohidrați, fosfolipide, acizi grași polinesaturați, etc.), în fitotehnie în calitate

de biostimulatori și biofertilizatori, bioconversia energiei solare, protecția mediului, etc. [71, 125, 227].

Prima utilizare a spirulinei este cea cunoscută în nutriția umană ca supliment alimentar sub formă de pulbere, tablete, capsule și extracte, dar caracteristicile funcționale ale spirulinei au permis și utilizarea acesteia în prepararea alimentelor într-un mod tradițional [111, 223]. Datorită ei, mâncarea capătă un gust nou, este îmbogățită cu proteine, vitamine și microelemente, la fel, capătă sau își mărește efectul antioxidant, îmbunătățind în același timp stabilitatea produselor alimentare [216].

Spirulina poate fi adăugată în multe băuturi și înghețate pentru a îmbunătăți valoarea nutrițională [70, 166]. Pulberea de spirulină se poate adăuga pentru a spori valoarea nutrițională a pâinii. Pâinea preparată capătă culoarea și mirosul specific, precum și este îmbogățită cu o cantitate mai mare de vitamine, microelemente, în special substanțe biologic active și se caracterizează printr-o perioadă de valabilitate mai lungă [70, 105, 329, 331]. Pulberea de spirulină este folosită la prepararea tăițelilor. Tăițelii capătă noi proprietăți nutriționale și organoleptice (culoare, miros și gust) și se caracterizează printr-o elasticitate crescută [150, 186, 216].

Salehifar și colab. (2013) au investigat posibilitatea utilizării spirulinei în producția de biscuiți tradiționali iranieni stabilind efectele ei asupra valorii nutriționale, culorii și texturii biscuiților. Rezultatele indică fezabilitatea producerii de biscuiți îmbogății cu această cianobacterie cu proprietățile nutriționale dorite [217].

Rumyantseva (2018) a demonstrat posibilitatea utilizării spirulinei în fabricarea de caramelă pentru bomboane, în vederea obținerii unui produs finit care să corespundă cerințelor GOST 6477-88, rezistent la modificări în timpul depozitării și care să asigure excluderea din rețetă a coloranților sintetici scumpi și totodată să crească și valoarea nutritivă a caramelei. Caramela rezultată poate fi recomandată pentru o gamă largă de consumatori ca produs funcțional [323]. Danesi și colab. (2010) au descris bomboanele Spirulina, care sunt făcute cu zahăr granulat, pectină, pulbere de spirulină, arahide și agar-agar [70].

Spirulina este un supliment alimentar promițător pentru îmbunătățirea calității laptelui de vacă [40]. Efectul stimulator sau protector al spirulinei este eficient pentru genul *Bifidobacterium*, datorită creșterii diminuate în lapte și a ratei de supraviețuire în produsele lactate fermentate convențional. Există date care demonstrează, că la adăugarea pulberii de spirulină uscată în iaurt crește viabilitatea bacteriilor [23, 101]. La fel, spirulina îmbunătățește semnificativ proprietățile nutriționale ale produselor finale și poate fi, de asemenea, un agent

antifungic. Ficocianina izolată din spirulină este utilizată în principal în calitate de colorant alimentar [104].

În prezent sunt fabricate peste 50 de tipuri de forme „alimentare sănătoase” (capsule, tablete și pulbere) care conțin spirulină. Companiile majore care sunt implicate în cultivarea spirulinei la nivel global sunt: *Earthrise Nutritionals* (USA California), *DIC Lifetec Spirulina* (Japan), *Cyanotech Spirulina* (USA Hawaii), *Boonsom Spirulina Farm* (Thailand), *FEBICO* (Taiwan), *Spirulina* (France/Laos), *Green Valley* (Germany), *Natesis Spirulina* (France), *All Seasons Health* (United Kingdom) ș. a.

Problema utilizării suplimentelor alimentare, care cresc rezistența organismului la efectele dăunătoare ale mediului extern, are o relevanță deosebită nu numai la nivel global, dar și în țara noastră, unde există, un dezechilibru alimentar exprimat, în special, în deficitul unei game întregi de elemente nutriționale, precum vitaminele, acizii grași polinesaturați, mineralele ș. a. substanțe. Astfel, suplimentele alimentare sunt folosite pentru a corecta alimentația populației în multe țări, inclusiv și în R. Moldova.

Una dintre direcțiile de perspectivă care necesită dezvoltare în domeniul alimentar este creșterea rezistenței nespecifice a organismului la influențele nefaste ale mediului, inclusiv și la stresul oxidativ. Îmbogățirea cianobacteriilor cu microelemente antioxidante într-o formă biodisponibilă extinde semnificativ posibilitățile de utilizare a acestora în nutriția terapeutică și profilactică.

Sinteza informației referitor la compoziția chimică a spirulinei și a datelor din literatura de specialitate privind utilizarea spirulinei în nutriția umană, face posibilă, într-o anumită măsură, conturarea zonei de aplicare a spirulinei ca supliment alimentar în terapia și profilaxia unor maladii. După cum s-a menționat deja, spirulina este o sursă naturală valoroasă de antioxidanți reprezentați în primul rând prin gama de pigmenți: carotenoizii, ficocianinele și clorofilele, care sunt, în același timp și imunomodulatori. Efectul antioxidant este, de asemenea, datorat și vitaminelor grupei B care se conțin în spirulină, aminoacizilor care conțin sulf (metionina și cisteina) ș. a. compuși. Un efect imunomodulator pronunțat îl are acidul gamma-linolenic polinesaturat din spirulină, care este de neînlocuit pentru organismul uman și cel animal [95, 111].

Spirulina este utilizată și în implementarea programelor de control a greutateii corporale ca parte componentă a dietelor [181]. Capacitatea spirulinei de a suprima senzația de foame este legată de prezența unui nivel destul de ridicat în compoziția sa, a aminoacizilor fenilalanina și tirozina care afectează metabolismul hormonal. Spirulina este o componentă și a dietelor aplicate în perioada postoperatorie pacienților ce au suferit intervenții chirurgicale la nivelul tractului

gastro-intestinal, au arsuri sau alte afecțiuni patologice. Se recomandă utilizarea spirulinei în terapia dietetică a patologiilor cardiovasculare: ateroscleroza, hipertensiunea și bolile coronariene [172, 227]. Tratamentul acestor boli necesită limitarea conținutului caloric, reducerea consumului de acizi grași saturați, colesterol, carbohidrați rafinați, sare și îmbogățirea dietei cu săruri de potasiu, vitaminele B1, B2, B6, PP, includerea antioxidanților care normalizează procesele de peroxidare a lipidelor membranelor celulare și procesele de coagulare a sângelui [112, 126].

Pentru a asigura o nutriție adecvată a pacienților cu diabet zaharat, se recomandă utilizarea spirulinei în alimentația lor ca sursă suplimentară de proteine complete, carbohidrați (ramnoză și glicogen), care nu suprasolicite aparatul insular, precum și a acizilor grași esențiali, vitaminelor și mineralelor implicate în calitate de cofactori ai transformărilor metabolice derulate de diabetul zaharat [24, 195, 201].

În calitate de sursă de proteine ușor digerabile spirulina este utilizată cu succes în nutriția medicală a copiilor subnutriți [173, 251].

Datorită conținutului ridicat de β -caroten, vitamine ale grupului B, macro- și microelemente, spirulina poate fi utilizată și în dieta unei persoane sănătoase pentru a spori imunitatea, a reduce riscul de anumite tipuri de cancer, ulcer, pentru a preveni îmbătrânirea, ajută la eliminarea toxinelor și la scăderea riscului de boli cardiovasculare, crește rezistența organismului, normalizează tensiunea arterială, reduce nivelul colesterolului în sânge, îmbunătățește memoria și claritatea mentală, etc [95, 111, 181, 177, 225, 231].

Sunt posibile și alte aspecte ale utilizării spirulinei, de exemplu, în nutriția specializată pentru sportivi; au fost dezvăluite proprietățile protectoare ale spirulinei în caz de intoxicație cu mercur și droguri [49, 170].

Spirulina este o componentă importantă a programului de alimentație a astronauților. Potrivit NASA, spirulina este o sursă ideală de hrană care poate fi cultivată într-un sistem închis, cum este o stație spațială, deoarece crește rapid și necesită puțin spațiu. Necesitatea ei în nutriție poate fi satisfăcută prin recirculare - oferind locuitorilor stației nu doar oxigen, ci și substanțe nutritive esențiale [128].

Sunt create astfel, toate premisele, pentru a considera spirulina drept un supliment alimentar menit să consolideze starea de sănătate și care crește capacitățile de adaptare ale organismului. Având proprietăți unice, spirulina și compușii săi sunt eficienți pentru prevenirea și tratamentul bolilor cronice ale sistemului respirator, ale inimii și vaselor sanguine, stomacului și intestinelor, ficatului și rinichilor, diabetului zaharat, anemiei, tulburărilor endocrine. Spirulina este continuu numită „cel mai bun aliment pentru viitor” cu restartarea programelor de

superalimente [172]. Într-un vast reviu bibliografic a fost demonstrat potențialul imunoreglator al spirulinei care conduce la prevenirea dezvoltării cancerului, infecțiilor virale, stărilor inflamatoare, alergiilor și imunodeficienței, crește activitatea macrofagelor, stimulează producția de anticorpi și citokine, activează celulele B și T [175, 225]. Au fost demonstrate efectele: antioxidant, antiinflamator, anticancer și modulator ale fracțiilor lipidice al unui supliment alimentar pe bază de spirulină, care conține în microdoze fier, cupru, vitamina B3, B2 și B1, în combinație cu proteina din spirulină. De asemenea, s-a raportat reducerea valorilor presiunii sanguine, dispariția rinitei alergice și menținerea glicemiei normale. În ceea ce privește efectul anticancer, recent a fost demonstrată implicarea spirulinei și a extractelor hidrice pe bază de această cianobacterie în activarea mecanismelor reparatoare a ADN-ului celular și ca rezultat, suprimarea creșterii țesutului canceros. Astfel, pe lângă oportunitatea utilizării spirulinei în calitate de supliment alimentar, spirulina este privită ca o sursă promițătoare de noi substanțe - pentru producerea de noi medicamente [95, 177, 281]. Spirulina fiind un produs cu valoare nutrițională și ecologică are proprietăți hipolipidemice, hipoglicemice și antihipertensive. Spirulina conține compuși funcționali, cum ar fi fenolii, ficocianinele și polizaharidele care posedă efecte antioxidante, antiinflamatoare și imunostimulatoare. Deși efectul antioxidant al spirulinei este confirmat de studiile de intervenție *in vivo*, modularea răspunsurilor antioxidante și inflamatoare necesită mai multe confirmări la om. Suplimentele pe bază de spirulină par să influențeze mai eficient imunitatea înăscută, promovând activitatea celulelor naturale ucigăse. Efectele asupra citokinelor și asupra proliferării limfocitelor depind de vârstă, sex și diferențele de greutate corporală. În acest context, îmbătrânirea și obezitatea, fiind asociate cu inflamația cronică, afectează microbiota intestinală. În rezultatul studiului *in vitro*, s-a presupus că asocierea spirulinei la probiotice ar putea reprezenta o nouă strategie de îmbunătățire a creșterii microbiotei intestinale.

În ultimii ani medicamentele pe bază de fitosubstanțe găsesc o aplicabilitate din ce în ce mai largă în practica medicală. Activitatea farmacologică a fitocompușilor, de regulă, nu este mai inferioară medicamentelor din compușii de sinteză chimică și, datorită unui complex echilibrat de substanțe biologice active, acționează asupra organismului uman, cu un minim de efecte secundare posibile. După cum s-a menționat deja, sunt cunoscute peste 50 de tipuri de produse sub formă de capsule, comprimate și pulbere care conțin spirulină, iar efectele terapeutice ale lor oferă o perspectivă sigură ale utilizării metodelor biotehnologice moderne în crearea de noi produse bioactive de origine naturală.

Printre primele proprietăți farmacologice stabilite ale compușilor biologici activi din spirulină sunt cea anticancer și cea radio- și chimioprotectoare ale unor extracte ale ei. Aceste

efecte au fost asociate cu prezența în compoziția extractelor a unui polizaharid care conține ramnoză, fucoză, xiloză, manoză, glucoză, galactoză. Au fost stabilite proprietățile antioxidante ale acestui polizaharid și s-a demonstrat capacitatea lui de a inhiba creșterea celulelor canceroase. A fost demonstrat, că polizaharidul sulfatat Ca-spirulan, izolat prin extracție apoasă din spirulina, a inhibat invazia tumorală și metastaza celulelor melanomului în plămâni [64, 183] și, de asemenea, a suprimat replicarea unor virusuri, inclusiv a virusului imunodeficienței umane de tip 1. Ca-spirulan inhibă infecția cu HSV-1 *in vitro* cu o potență cel puțin comparabilă cu cea a aciclovirului, prin blocarea fixării virusului și penetrării în celulele gazdă. În modelul clinic de tratament al herpesului labial prin aplicare externă, efectul profilactic al polizaharidului Ca-spirulan a fost superior aciclovirului.

Aceste date indică o utilizare clinică potențială a polizaharidelor din spirulină pentru tratamentul profilactic al herpesului labial și sugerează o posibilă activitate a Ca-SP împotriva infecțiilor cauzate de alte virusuri herpetice [165].

Un alt polizaharid sulfatat derivat din spirulină este Na-SP (Sodiu-Spirulan), un compus care prezintă activitate antitrombinică prin activarea cofactorului heparinei II. De asemenea, Na-SP influențează funcțiile celulelor endoteliale vasculare, astfel ca proliferarea, repararea leziunilor și metabolismul proteoglicanilor [33, 80, 108, 122 - 123, 165].

Dezvoltarea tulpinilor virale și apariția mutațiilor virusurilor gripale a împiedicat dezvoltarea vaccinurilor și tulpinilor rezistente la medicamentele antivirale existente. Au fost demonstrate efectele antivirale ale produselor derivate din spirulină aplicate în doza de până la 5,0 mg/kg/zi sau 3,0 mg/kg/zi timp de 14 zile succesiv. Studiile de eficacitate antigripală au arătat, că extractul de spirulină a inhibat formarea plăcii virale într-o gamă largă de virusuri gripale, inclusiv a tulpinilor rezistente la oseltamivir. S-a constatat, că extractul din spirulină acționează într-un stadiu incipient al infecției prin reducerea sarcinii virale în celule și îmbunătățirea rezistivității la infecția gripală. Rezultatele obținute sugerează, că extractul hidric din spirulină ar putea servi drept agent terapeutic sigur și eficient pentru gestionarea focarelor de gripă [62].

Acizii fenolici, clorofila, carotenoizii, ficobiliproteinele și enzimele antioxidante sunt printre compușii implicați în activitatea antiradicalică și antioxidantă a spirulinei [32, 116]. S-a stabilit, că activitatea antioxidantă a fracțiilor proteice din spirulină în raport cu radicalii hidroxil și peroxil este asociată cu conținutul de C-ficocianină din aceste fracții [82, 112].

C-ficocianina este reprezentanta principală a ficobiliproteinelor din spirulină, și printre efectele demonstrate, derivate din activitatea ei antioxidantă, sunt cele anticancer,

hepatoprotectoare, neuroprotectoare, renoprotectoare, cardiovasculare protectoare, anticataractă. C-ficocianina se prezintă și în calitate de agent antiinflamator și imunomodulator eficace [156].

Direcția de cercetare legată *de evaluarea experimentală a diferitor substanțe biologice active sau extracte ce conțin aceste substanțe derivate din biomasa de spirulină care prezintă efecte farmacologice* a fost dezvoltată destul de intens de către cercetătorii din domeniul ficobiotehnologiei din R. Moldova. Conceptul valorificării compușilor biologici activi din spirulina / *Arthrospira platensis* în calitatea lor de parte activă a preparatelor medicamentoase s-a soldat cu crearea preparatului BioR® [11 - 12]. Partea activă a preparatului este redată de o combinație de compuși biologici activi (aminoacizi și oligopeptide, polizaharide sulfatate, fosfolipide, macro- și microelemente), care au fost extrași succesiv din biomasa de spirulină și purificați. Într-un ciclu de studii experimentale realizate în R. Moldova, Canada și Germania au fost stabilite, iar în cercetările clinice, au fost confirmate proprietățile terapeutice benefice ale acestui preparat asupra stării organismului în diverse patologii. BioR® ul s-a dovedit a fi un preparat multifuncțional care prezintă activitate antioxidantă, citoprotectoare, regenerantă, imunomodulatoare (adaptogenă), antiinflamatoare, antivirală, hepatoprotectoare, antiaterogenă. BioR® ul protejează celula, previne îmbătrânirea acesteia și, în plus, participă la restabilirea funcțiilor celulare dacă acestea sunt afectate de unii factori nefavorabili. De asemenea, are proprietăți bacteriostatice asupra bacteriilor și ciupercilor patogene.

Rezultatele terapeutice bune și eficiența preparatului, declarate la utilizarea lui în schemele de tratament a unui șir de maladii au condus la elaborarea unor produse farmaceutice și a tehnologiilor de fabricare a lor în serie. Acesta a fost scopul construirii în R. Moldova a unei uzine cu profil mixt de producere (Ficotehfarm, or. Chișinău), în cadrul căreia au fost combinate într-un singur flux obținerea biomasei de spirulină ca materie primă și a extractelor din aceasta - în calitate de materii prime farmaceutice. În colaborare cu uzinele farmaceutice dotate cu fluxuri de fabricare specializate a medicamentelor (Farmaco, Farmaprim, Eurofarmaco, R. Moldova) a fost inițiată fabricarea în serie a produselor farmaceutice pe bază de BioR®. Acestea au inclus soluția injectabilă BioR® care și-a dovedit eficiența în tratamentul afecțiunilor stomatologice, maladiilor ficatului și cardiovasculare, tuberculozei, neurologice, în suportul sistemului imun, servind în calitate de imunomodulator ș. a. Două alte produse farmaceutice în baza preparatului, sunt ovulele (pentru tratarea patologiilor feminine) și supozitoarele BioR® (pentru tratarea patologiilor asociate cu adenomul de prostată).

Eurofarmaco a înregistrat și distribuie în R. Moldova și România trei suplimente nutraceutice, dintre care două sunt noi. BioR® capsule, Imunobior® capsule (conține, pe lângă BioR® într-o cantitate mai mare zincul și complexul de polizaharide sulfatate din spirulina) și

Aterobior® capsule (conține în rapoturi optime BioR®, fosfolipide, acizi grași nesaturați, polizaharide sulfatate, proteine și seleniu încorporat) (Anexa 3).

Eficacitatea preparatelor din *Arthrospira platensis* (spirulina) în raport cu diferite patologii metabolice se datorează compoziției echilibrate și proprietăților compușilor bioactivi care se conțin în biomasa acestei cianobacterii. De rând cu compușii săi bioactivi, activitatea în particular, cea antioxidantă și chelatorie ridicată dar și alte proprietăți ale preparatelor pe bază de *Arthrospira platensis* este asociată cu prezența complexelor bioorganice cu microelemente esențiale încorporate în structura lor și respectiv, cu un grad ridicat de biodisponibilitate a acestora pentru organismul uman și cel animal.

Astfel, spirulina/*Arthrospira platensis* este o sursă bioorganică de microelemente. De rând cu vitaminele, microelementele sunt cei mai importanți micronutrienți care asigură funcționarea normală a tuturor sistemelor organismului uman și cel animal.

Carența microelementelor (ca și în cazul seleniului și germaniului analizate în acest compartiment) influențează în mod negativ starea de sănătate și poate fi suplinită prin corecția dietetică a dozei microelementului prin utilizare în alimentația zilnică de către o persoană sănătoasă, precum și prin nutriție profilactică și terapeutică, folosind alimente îmbogățite cu microelemente și suplimente alimentare - surse de microelemente. Adesea pentru producerea suplimentelor alimentare, se folosesc sărurile anorganice ale microelementelor, care în majoritatea cazurilor au un nivel de asimilare relativ scăzut și o limită foarte redusă a concentrației admisibile, ceea ce crește pericolul intoxicației în caz de supradozare.

Prin alimentele consumate zi de zi, organismul uman primește microelementele, în particular, sub formă organică din produsele alimentare vegetale și animale, astfel încât consumul lor sub formă anorganică poate fi cu greu justificată. Prin urmare, noile surse alimentare cu forme organice de microelemente obținute prin metode biotehnologice prezintă un interes semnificativ. Spirulina este unul dintre cele mai avantajoase obiecte pentru încorporarea oligoelementelor; în plus, are un perete celular ușor asimilabil [12, 184]. Adăugarea de săruri anorganice a microelementelor în mediul nutritiv și cultivarea spirulinei în prezența acestora, duce la includerea acestora în compoziția ei [319]. În același timp, ca rezultat al „bioconversiei”, spirulina se îmbogățește în forme organice ale unui microelement încorporat fie în complecși chelați, dacă vorbim despre aminoacizi și proteine care conțin cupru, zinc, crom, mangan și aminoacizi cu seleniu - în cazul seleniului [56, 58, 89, 326].

Reieșind din cele expuse este oportună și actuală elaborarea preparatelor, care are la bază capacitatea cianobacteriei *Arthrospira platensis* de a biotransforma și de a forma biocomplexe endogene cu elementele de interes care sunt ușor asimilate de către organismul uman.

Controlul analitic face posibilă stabilirea relației între concentrația unui anumit element în mediul nutritiv și conținutul acestuia în biomasa spirulinei obținută. Această dependență servește drept reper la obținerea materiei prime pentru preparatele cu doze prognozate ale unui anumit oligoelement. În același timp, este foarte important ca concentrațiile de compuși adăugați la mediul nutritiv să nu afecteze condițiile în care celulele spirulinei cresc normal și își păstrează proprietățile naturale benefice.

Preparatele pe bază de spirulină, conținând un întreg complex de substanțe biologice active și microelemente biotransformate, obținute pe cale biotehnologică, sunt atât oportune, cât și de perspectivă, oferind efecte terapeutice și de ameliorare a sănătății. Spre exemplu, preparatele care conțin seleniu obținute pe bază de spirulină vor crește proprietățile hepatoprotectoare, iar preparatele cu germaniu bioorganic vor intensifica efectele lor anticancer și cele imunomodulatoare. În plus, îmbogățirea biomasei cu microelemente cu efect antioxidant într-o formă biodisponibilă extinde semnificativ posibilitățile de utilizare a acestora în alimentația terapeutică și profilactică.

1.4 Concluzii la capitolul 1

1. Seleniul și germaniul prezintă un interes major din punct de vedere al efectelor pozitive exercitate asupra organismului uman și animal, și este oportun să se dezvolte în continuare direcția de cercetare orientată spre obținerea de noi preparate care conțin aceste microelemente.
2. În pofida faptului, că piața farmaceutică oferă o gamă destul de largă de diferite preparate care conțin seleniu și/sau germaniu, nu există nici un produs care să întrunească toate criteriile de complexitate dorite: un compus organic natural, o bună asimilare, utilitate, fără efecte secundare și un preț accesibil.
3. Mineralele din alimente sunt în formă legată într-un complex natural cu proteinele, carbohidrații și lipidele. Organismul uman recunoaște acest complex ca un tot întreg. Majoritatea suplimentelor sunt analogi sintetici ai mineralelor, sau sunt asociate cu un complex biologic și pot avea o structură diferită de cele naturale (în care mineralele pot fi biotransformate).
4. Preparatele farmaceutice pot, de asemenea, să nu ia în considerare efectele antagoniste și synergice ale mineralelor, atât în timpul adsorbției în tractul digestiv, cât și în timpul reacțiilor metabolice celulare.

5. Cianobacteria *Arthrospira platensis* (spirulina) este un obiect biotehnologic foarte promițător în continuare, cu un metabolism labil care oferă un spectru larg de compuși biologic activi, inclusiv cei care biotransformă microelementele. Datorită acestui fapt, spirulina își poate găsi aplicații nu doar în utilizarea ca bază sau componentă a suplimentelor alimentare, ci și poate aparține unei noi generații de aceste produse, concepută pentru a-și ocupa ferm nișa în structura nutriției umane în secolul XXI, precum și în calitate de agent farmacologic eficient.

Cele expuse în sinteza și analiza informației la tema lucrării, redată în acest capitol, au permis de a formula problema de cercetare importantă care rezidă în fundamentarea științifică a capacității tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) de a acumula și biotransforma seleniul și germaniul din compuși chimici, în scopul utilizării acestei capacități drept reper în elaborarea procedeeleor noi de obținere a biomasei îmbogățite cu seleniu și/sau germaniu, iar în baza acestei biomase, a preparatelor noi cu conținut sporit de aceste microelemente de importanță biologică.

Direcțiile de rezolvare a problemei de cercetare au constatat în:

- (1) stabilirea capacității de producere a biomasei și de acumulare a seleniului și germaniului de către tulpina cianobacteriei *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivarea ei în prezența unor compuși chimici ai Se (IV) și Ge (IV);
- (2) evaluarea modificărilor în compoziția biomasei pe fonul conținutului acumulat de aceste microelemente de către spirulina;
- (3) determinarea condițiilor optime care asigură obținerea unei biomase cu conținut sporit de seleniu și germaniu biotransformate;
- (4) elaborarea schemelor tehnologice de obținere din biomasa de spirulină, în cadrul unui singur flux, a preparatelor ce conțin seleniul și/sau germaniul ca parte componentă efectivă.

Astfel, au fost formulate și propuse spre realizare în cadrul tezei două obiective majore care au constatat în:

- 1) Elaborarea biotehnologiei de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de seleniu;
- 2) Elaborarea biotehnologiei de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de germaniu.

2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE

Cercetările științifice la tema tezei de doctorat au fost efectuate în cadrul Laboratorului Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, Laboratorului Ficobiotehnologie al Universității de Stat din Moldova și la uzina FICOTEHFARM, or. Chișinău.

2.1 Obiectul de studiu

În calitate de obiect de studiu a servit tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) [19]. Tulpina este depusă în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

Pentru cultivarea spirulinei s-a utilizat mediul nutritiv Zarrouk [314] cu următoarea compoziție, g/l: NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -16,8; NaCl -1,0; K_2SO_4 -1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,04; FeSO_4 -0,01; EDTA-0,08 și câte 1 ml soluție de microelemente ce conține (mg/l): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015.

Pentru cultivarea spirulinei în prezența compușilor seleniului a fost utilizat mediul Zarrouk modificat cu următoarea componență (g/l): NaHCO_3 -2,0; K_2HPO_4 -0,5; NaNO_3 -2,5; K_2SO_4 -0,5; NaCl -1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,04; FeSO_4 -0,01; EDTA-0,08 la care s-a adăugat 1 ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015 [20].

Pentru cultivarea spirulinei în prezența compușilor organici ai germaniului a fost utilizat mediul Zarrouk modificat cu următoarea componență (în g/l) NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -8,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -0,6; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,024; FeSO_4 -0,01; EDTA-0,08 și 1ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015 [7].

Cultivarea s-a efectuat timp de 144 ore, în baloane Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie de spirulină cu concentrația start a culturii (inoculumul) – 0,4 - 0,45 g/l BAU. Pe durata experiențelor s-au respectat parametrii de cultivare: 1) pentru primele 48 ore: temperatura de 28 °C, pH-ul optimal al mediului 8 - 9, iluminarea continuă de 37 μM fotoni/ m^2/s și, 2) pentru următoarele 96 ore: temperatura de 30 °C, pH-ul = 9 - 10, intensitatea iluminării până la 55 μM fotoni/ m^2/s .

2.2 Compuși ai seleniului și germaniului

În calitate de sursă de seleniu la cultivarea spirulinei au fost utilizați 6 compuși anorganici ai Se (IV): Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$, ZnSeO_3 , GeSe_2 , CoSeO_3 (Sigma-Aldrich) și compusul $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sintetizat de către dr. hab., prof. Șova Sergiu (Centrul de Cercetări Științifice Chimie aplicată și ecologică, Universitatea de Stat din Moldova).

În calitate de surse de germaniu au fost utilizați compuși anorganici și organici ai Ge (IV). Compușii anorganici GeO_2 și GeSe_2 au fost procurați de la compania Sigma-Aldrich (Germania). Compușii organici $\text{Mes}_2\text{GeCl}_2$ - (FM-1), $\text{MesGe}(\text{OMe})_2$ - (FM-2), $\text{ArP}=\text{C}(\text{Cl})\text{Ge}(\text{F})(\text{Tip})\text{t-Bu}$ - (FM-3), $\text{ArP}=\text{C}(\text{Te})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ - (FM-8), $\text{ArP}=\text{C}(\text{SeSe})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ - (FM-9), $\text{ArP}=\text{C}(\text{PhCH}=\text{CHCHO})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ - (FM-10) și $\text{Mes}_2\text{Ge}(\text{F})\text{-PHMes}$ - (FM-11) au fost obținuți prin sinteză în laboratorul de Heterochimie fundamentală și Aplicată a Universității P. Sabatier, Toulouse, Franța (Laboratoire Hétérochimie Fondamentale et Appliquées de l'Université P. Sabatier, Toulouse, France).

2.3 Metodele de cercetare

Au fost utilizate metodele și tehnicile specifice cercetărilor ficologice, adaptate pentru tulpina de spirulină utilizată în această lucrare.

2.3.1 Determinarea conținutului de biomasă de spirulină.

Principiul metodei spectrofotometrice de determinare a conținutului de biomasă de spirulină constă în înregistrarea absorbantei suspensiei colorate și stabile, obținute prin diluții cu apă purificată, cu determinarea cantitativă ulterioară prin cântărire. Metoda a fost propusă în 1993 [18]. În prezent, metoda spectrofotometrică este tot mai frecvent utilizată în aprecierea cantității de biomasă ficologică. Metoda este rapidă și eficientă [179, 219].

Reagenți: Apă distilată; Acetat de amoniu ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) chimic pur.

Prepararea soluției de acetat de amoniu de 1,5%. 1,5 g $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ se dizolvă în 50 ml apă distilată, după care amestecul se trece într-un balon volumetric de 100 ml și se aduce până la cotă cu apă distilată.

Determinarea cantității de biomasă:

Determinarea coeficientului de recalculare a biomasei native de spirulină la biomasa absolut uscată: La finalizarea ciclului de creștere a culturii – 6 zile, din vasul cu cultura de spirulină, se transferă în trei eprubete din sticlă câte 1,0 ml de suspensie de spirulină la care se adaugă câte 2,0 ml de apă distilată, se amestecă și la lungimea de undă de 680 nm se citește absorbanta soluțiilor formate, care nu va depăși valoarea de 0,3. După măsurarea absorbantei

cultura de spirulină se filtrează la instalația de filtrare cu vid, pe un filtru de hârtie demineralizat, în prealabil uscat până la masă constantă la temperatura de 105 ± 2 °C și cântărit. Biomasa nativă de pe filtru, se spală timp de 3 - 5 min cu soluție de acetat de amoniu de 1,5%, pentru a înlătura surplusul de săruri de pe suprafața celulelor de spirulină. Ulterior, filtrul cu biomasă se plasează în dulapul de uscare la temperatura de 105 ± 2 °C și se usucă timp de o oră, după care se răcește la temperatura camerei până la masă constantă, se cântărește la balanța analitică și se determină biomasa absolut uscată cu recalcularea pentru 1,0 litru suspensie de spirulină.

Calculul rezultatelor se face conform formulei:

$$(B_2 - B_1) / A_{680} \times 100 \text{ g/l} \quad (2.1)$$

unde:

B_1 - greutatea filtrului spălat și uscat;

B_2 - greutatea filtrului cu biomasă uscat și răcit până la temperatura camerei;

A_{680} - absorbanta suspensiei de spirulină la 680 nm;

100 - coeficientul de recalcul pentru 1,0 l suspensie spirulină.

Se calculează coeficientul corelării valorilor absorbantei la valorile masei de spirulină (g) conform formulei:

$$K = m(\text{g/l}) / A_{680} \quad (2.2)$$

unde:

m - masa probei;

A_{680} - valoarea absorbantei înregistrate la 680 nm.

Prelucrarea și standardizarea biomasei de spirulină: Cultura de spirulină, obținută în rezultatul experiențelor se măsoară pentru a stabili volumul ei. Din fiecare vas cu cultura de spirulină se prepară probele pentru înregistrarea absorbantei. În eprubete de sticlă se iau a câte 1,0 ml cultură la care se adaugă 2,0 ml apă distilată. Se prepară trei repetări pentru fiecare probă. Se înregistrează absorbanta probelor la lungimea de undă de 680 nm cu utilizarea aplicației QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului T60 PG *Instruments* pentru care se introduce valoarea coeficientului, determinat pentru biomasa spirulinei, în formula calculului cantitativ.

Cultura de spirulină se trece prin sistemul de filtrare care constă din vasul de sticlă pentru colectare Kitasato și pâlnie Buchner, conectate la pompă cu vid. Biomasa de spirulină de pe filtrul de hârtie se demineralizează cu soluția de acetat de amoniu de 1,5%, după care se spală cu volumul de apă distilată până la care trebuie adusă biomasa de spirulină corespunzător concentrației de 10 mg/ml și care se determină după următoarea formulă:

$$V_2 = A_{680} \times K \times \eta \times V_1 / C \quad (2.3)$$

unde:

A - absorbanța probei cu spirulină la 680 nm;

K - coeficientul de recalcul a biomasei native de spirulină la biomasa absolut uscată - BAU;

η - diluția;

V_1 - volumul biomasei până la filtrare, ml;

V_2 - volumul la care se aduce proba cu apă la concentrația finală de 10 mg/ml.

Prepararea biomasei de spirulină pentru testele biochimice: Pentru a asigura distrugerea peretelui celular al spirulinei și accesibilitatea conținutului de masă celulară pentru analizele biochimice, biomasa se congelează timp de 24 ore la temperatura de la minus 10 °C până la minus 30 °C. La expirarea timpului de expunere congelării, biomasa se plasează la temperatura camerei pentru o durată de timp în care biomasa se decongelează complet. Apoi, biomasa se agită bine și se supune procedurii de congelare - decongelare încă de cel puțin 5 ori.

2.3.2 Determinarea conținutului de proteine în biomasa de spirulină

Principiul metodei: A fost utilizată Metoda Lowry, care are la bază două reacții diferite. Prima reacție constă în formarea complexului cuprului cu legăturile amidice (peptidice), urmată de reducerea cuprului în condiții alcaline. Produsul rezultat se numește cromofor biuret, care este stabilizat prin adăugarea de tartrat [98]. A doua reacție este reducerea reactivului Folin-Ciocalteu de către complexul cuprului redus (obținut în prima reacție) cu legături amidice, precum și cu reziduurile aminoacizilor tirozina și triptofanul [87]. În mediu alcalin, ionii Cu^{2+} formează un complex cu legăturile peptidice, reducându-se la Cu^+ . Ionii de cupru monovalenți reacționează cu reagentul Folin-Ciocalteu (acid fosfomolibdic cu fenol), formând un produs instabil care se transformă în albastru de molibden, cu absorbanta maximală la 750 nm. Creșterea absorbției la 750 nm este proporțională cu concentrația de proteine. Metoda este foarte sensibilă la prezența agenților reducători străini în soluție. Reactivul Folin-Ciocalteu în formă redusă are o culoare albastră (violet) care este detectat spectrofotometric. Conform intensității culorii soluției, se determină concentrația proteinelor [160]. Sensibilitatea metodei este de 2 $\mu\text{g/ml}$. Limita de concentrații determinate este de la 5 la 500 $\mu\text{g/ml}$.

Reagenți: 1. Sulfat de cupru pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) chimic pur; 2. Tartrat de sodiu și potasiu tetrahidrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) chimic pur. Poate fi utilizată sarea tartrat de potasiu sau de sodiu. Tartratul poate fi substituit cu citrat de sodiu $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, chimic pur; 3. Carbonat de sodiu (Na_2CO_3) chimic pur; 4. Hidroxid de sodiu (NaOH) chimic pur; 5. Reagentul Folin-

Ciocalteu 2 N, Merck: Reactivul fenol generează cromogeni care dau absorbantă maximală între 550 - 750 nm. În mod normal, absorbanta la 750 nm sau 660 nm (două maxime de absorbție) sunt utilizate pentru a cuantifica concentrațiile de proteine între 1 - 100 mg/ml, în timp ce absorbanta la 550 nm este utilizată pentru a cuantifica concentrații mai mari de proteine; 6. Albumină serică bovină, Merck; 7. Apă distilată; 8. Alcool etilic 96% pentru prelucrarea cuvelor.

Prepararea reagenților:

Reagentul A: Se prepară soluția de hidroxid de sodiu de 0,1 N. Pentru aceasta 0,4 g NaOH se dizolvă în apă distilată în balon cotat cu volumul de 100 ml. Se prepară soluția de 2,0% carbonat de sodiu. Pentru aceasta 2,0 g Na_2CO_3 se dizolvă într-un volum mic de hidroxid de sodiu de 0,1N, după care volumul soluției se aduce la 100 ml cu aceeași soluție de hidroxid de sodiu. Soluția este valabilă timp de 30 zile.

Reagentul B: Se prepară soluția de sulfat de cupru de 0,5% în soluție de tartrat de sodiu sau potasiu de 1%. Tartratul de sodiu și/sau potasiu cu masa de 1,0 g se dizolvă în 40 ml apă distilată. Sulfatul de cupru cu masa de 0,5 g se dizolvă în 40 ml apă distilată. Soluțiile obținute se amestecă și se aduce volumul soluției formate la 100 ml cu apă distilată. Soluția obținută este transparentă. Soluția este valabilă timp de 60 zile.

Reagentul C: Reagentul C se obține prin amestecarea a 49 ml reagent A cu 1,0 ml reagent B. Soluția este utilizată în aceeași zi. Cantitatea de lucru a reagentului C se determină în dependență de numărul probelor supuse analizei.

Reagentul D: Se prepară soluția de reagent Folin-Ciocalteu de 0,1 N. Se dizolvă reagentul Folin-Ciocalteu cu apă distilată în raport de 1/3 v/v. Soluția este utilizată în aceeași zi.

Soluție stoc albumină: Se cântăresc 25,0 mg albumină serică bovină și se trec cantitativ într-un balon cotat cu volumul de 50 ml. Albumina se dizolvă treptat, prin agitare lentă în 0,1 N hidroxid de sodiu.

Pregătirea probelor pentru analiză: *Extragerea alcalină.* Din fiecare probă de biomasă standardizată de spirulină (10 mg/ml), supusă procedurii de congelare-decongelare, se colectează în eprubete câte 0,1 ml biomasă. După, la fiecare dintre eprubetele numerotate cu biomasa deja turnată se adaugă 0,9 ml soluție de NaOH de 0,1 N, se amestecă cu ajutorul agitatorului și se lasă pentru 30 min la temperatura camerei. Se obține hidrolizatul alcalin.

Determinarea conținutului de proteine:

Reacția Biuret + reactiv Folin-Chocalteu. După expirarea a 30 de min, din hidrolizatul alcalin se iau 0,2 ml și se introduc în eprubete de sticlă. La volumul de 0,2 ml extract se adaugă 0,8 ml apă distilată (pentru diluarea probei). Volumul de lucru este de 1,0 ml la care se adaugă 1,5 ml soluție C. Amestecul obținut se agită și se expune la temperatura camerei pentru 10 min,

după care, la conținutul eprubetei se adaugă 0,5 ml soluție D. Amestecul obținut se agită intens cu ajutorul unui vortex după care se expune pentru 45 - 50 de min în condiții de întuneric la temperatura camerei. După expirarea timpului de incubare se măsoară absorbanta probelor la lungimea de undă de 750 nm față de proba oarbă.

Proba oarbă. La 1,0 ml apă distilată se toarnă 1,5 ml de reactiv C, amestecul se agită și după 10 min de expunere la temperatura camerei, se adaugă 0,5 ml de reactiv D și se agită energic. După 45 - 50 de min de expunere în condițiile identice pentru probele experimentale, este utilizată ca referință zero la măsurarea probelor experimentale.

Construirea curbei de calibrare. Curba de calibrare se construiește în baza unor diluții succesive (în trei repetări) ale soluției stoc de albumină serică bovină. Se iau câte 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml.....0,9 ml din soluția standard de albumină serică bovină. Volumul probelor se aduce la 1,0 ml cu apă distilată. La 1,0 ml soluție rezultată se adaugă 1,5 ml de soluție C, se agită și după 10 min de expunere la temperatura camerei, se adaugă 0,5 ml de soluție D. Amestecul se agită energic. După 45 - 50 de min de expunere la întuneric la temperatura camerei se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 750 nm *vis-a-vis* de proba oarbă. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului T60 PG *Instruments*. Se verifică r^2 , pentru care valoarea acceptată este de 0,99. După fixarea valorii $r^2 = 0,99$ se obține valoarea pentru coeficientul K, utilizat în calculul cantitativ al proteinei. Formula de calcul este:

$$K=C/A_{750} \quad (2.4)$$

unde:

C - concentrația proteinei, mg/ml,

A_{750} - absorbanta probei la 750 nm.

Calculul conținutului cantitativ de proteine în probe se efectuează cu aplicarea formulei de calcul:

$$C=A_{750} \times K \times \eta \times 100\%/m \quad (2.5)$$

unde:

C - concentrația proteinei în probă, % biomasa absolut uscată;

A_{750} - absorbanta la 750 nm;

K - coeficientul de recalcul (în mg proteină/ml probă) determinat din curba de calibrare

η - diluția;

m - masa probei pentru analiză, mg.

2.3.3 Determinarea conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină

Principiul metodei: Metoda spectrofotometrică are la bază determinarea valorilor maxime ale absorbanței, specifice pentru extractul hidric de C-ficocianină la lungimea de undă de 620 nm și pentru extractul hidric de aloficocianină – la 650 nm.

Pregătirea probelor pentru analiză: În eprubete Eppendorf se iau câte 1,0 ml biomasă de spirulină cu concentrația de 10 mg/ml, care a fost supusă procedurii de congelare-decongelare de cel puțin de 9 ori. Probele se centrifughează la un regim de 11000 rpm, temperatura 22 °C, timp de 10 min. Supernatantul se colectează în eprubete pentru centrifugare din sticlă.

Determinarea ficobiliproteinelor:

Pregătirea probelor experimentale. Supernatantul colectat se diluează cu apă distilată, astfel încât absorbanta la lungimea de undă de 620 nm să nu depășească valoarea de 0,5. Probele diluate se agită lent și se înregistrează absorbanta lor la lungimile de undă de 620 nm și de 650 nm *vis-a-vis* de proba oarbă (apă distilată) utilizând aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE a spectrofotometrului T60 PG *Instruments*. Calculul conținutului cantitativ de ficobiliproteine în probe se efectuează în baza ecuațiilor [229]:

Pentru C-ficocianină:

$$C_{\text{fico}} = (A_{620} - 0,474 \times A_{650}) \times \eta \times 100\% / (5,34 \times m) \quad (2.6)$$

unde:

C_{fico} - concentrația ficocianinei, % biomasa absolut uscată;

A_{620} - absorbanta la 620 nm;

A_{650} - absorbanta la 650 nm;

η - diluția, ml;

m - masa probei pentru analiză, mg.

Pentru aloficocianină:

$$C_{\text{alofico}} = (A_{650} - 0,208 \times A_{620}) \times \eta \times 100\% / (5,09 \times m) \quad (2.7)$$

unde:

C_{alofico} - concentrația aloficocianinei, % biomasa absolut uscată;

A_{620} - absorbanta la 620 nm;

A_{650} - absorbanta la 650 nm;

η - diluția, ml;

m - masa probei pentru analiză, mg.

2.3.4 Determinarea conținutului de glucide în biomasa de spirulină cu utilizarea reagentului antron

Principiul metodei: Metoda are la bază descompunerea glucidelor în monozaharide într-un mediu puternic acid, urmată de deshidratarea lor și formarea de hidroximetilfurfural, care formează în reacția cu reagentul antron (9(10H)-Anthracenonă, $C_{14}H_{10}O$) un compus complex verde-albăstrui. Dependența corelațională a intensității culorii de conținutul de glucide din proba testată este observată în intervalul concentrației de monozaharide 0,02-0,10 mg/ml [110]. Metoda este utilizată în algologie [86].

Reagenți: Acid sulfuric concentrat (H_2SO_4) chimic pur; Reagent antron (9(10H)-Anthracenonă, $C_{14}H_{10}O$) chimic pur; D-glucoză, grad puritate $\geq 98\%$; Apă distilată; Alcool etilic de 96% pentru prelucrarea cuvelor.

Prepararea reagenților:

Reagentul Antron: 50,0 mg reagent antron se dizolvă în 100 ml acid sulfuric de 66%. Soluția obținută se expune la întuneric pentru 4 ore.

Soluția stoc de glucoză: 0,01 g D-Glucoză se trec într-un balon cotat cu volumul de 100 ml și se dizolvă în 50 ml apă distilată la agitare lentă timp de 10 - 20 min. După dizolvarea completă a glucozei, volumul soluției este adus la cotă.

Pregătirea probelor pentru hidroliza acidă: Probele cu biomasa de spirulină supusă analizei se diluează de 10 ori. Din fiecare probă se colectează în eprubete de sticlă câte 0,2 ml biomasă de spirulină.

Determinarea conținutului de glucide:

La 0,2 ml biomasă de spirulină, diluată în prealabil de 10 ori, se adaugă cu precauție 2,0 ml de reagent antron. Procedura se efectuează foarte atent pe gheață. Amestecul se supune agitării timp de 10 min la temperatura camerei. Probele obținute în așa fel se plasează pe baia de apă la 100 °C pentru 10 min. Probele sunt acoperite cu căpăcele pentru fierbere. Probele se răcesc sub apă curentă rece și se expun la întuneric la temperatura camerei pentru 30 min. După expoziție, se înregistrează absorbanta probelor la lungimea de undă de 620 nm *vis-a-vis* de proba oarbă.

Pregătirea probei oarbe. Se amestecă 0,2 ml apă distilată cu 2,0 ml reagent antron. Procedura se efectuează precaut pe gheață. Amestecul se expune la temperatura camerei pentru 10 min. Proba obținută se plasează pe baia de apă la 100 °C timp de 10 min. Apoi, proba se răcește sub apă curentă rece și se expune la întuneric la temperatura camerei pentru 30 min. După expoziție, proba este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

Construirea curbei de calibrare. Curba de calibrare se construiește în baza unor diluții succesive ale soluției standard de glucoză. Probele sunt preparate corespunzător în triplicat. Se iau 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml.....0,9 ml din soluția standard de glucoză. Volumul probelor se aduce la 10,0 ml cu apă distilată. Din fiecare probă de glucoză se iau câte 0,2 ml la care se adaugă 2,0 ml soluție antron. Amestecul se agită și se expune la temperatura camerei pentru 10 min. Probele obținute se expun la fierbere pe baie de apă la 100 °C pentru 10 min. După hidroliză și răcirea probelor până la temperatura camerei, se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 620 nm *vis-a-vis* de proba oarbă. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului T60 PG *Instruments*. Se verifică r^2 , pentru care valoarea acceptată este de 0,99. După fixarea valorii $r^2 = 0,99$ se obține valoarea pentru coeficientul K, utilizat în calculul cantitativ al glucidelor. Formula de calcul este

$$K=C/A_{620} \quad (2.8)$$

unde:

C - concentrația glucozei în probe, mg/ml;

A_{620} - absorbanta probei la 620 nm.

Curba de calibrare se construiește de fiecare dată când sunt preparați reagenții.

Conținutul cantitativ de glucide în probe se calculează cu utilizarea coeficientului de recalcul, după formula:

$$C=A_{620} \times K \times \eta \times 100\%/m \quad (2.9)$$

unde:

C - concentrația glucidelor în probă, % biomasa absolut uscată;

A_{620} - absorbanta la 620 nm;

K - coeficientul de recalcul (în mg glucide/ml probă) determinat din curba de calibrare;

η - diluția;

m - masa probei pentru analiză, mg.

2.3.5 Determinarea conținutului de lipide în biomasa de spirulină

Principiul metodei: Metoda are la bază reacția de culoare dintre produsele hidrolizei acide a lipidelor cu componentele reagentului fosfo-vanilinic. Intensitatea culorii obținute depinde de cantitatea lipidelor în probă. Produsele hidrolizei lipidelor formează cu reagentul fosfo-vanilinic culoarea roză.

Reacția sulfo-fosfo-vanilină (SPV) pentru determinarea lipidelor a fost introdusă pentru prima dată de Chabrol și Charonnat în 1937 și a fost folosită ca test de rutină pentru estimarea lipidelor totale din lichidul cefalorahidian uman cu un conținut redus de lipide [59, 254]. Pentru

biomasa algală, metoda data se aplică tot mai frecvent, înlocuind metoda gravimetrică Folch [47]. Avantajul metodei constă în rapiditatea efectuării, posibilitatea testelor repetate, sensibilitate, adaptarea materialului biologic utilizat. Metoda este utilizată frecvent în cercetările ficologice [200].

Reagenți: Cloroform distilat; Acid sulfuric concentrat (H_2SO_4) chimic pur; Acid o-fosforic 85% (H_3PO_4) chimic pur; Vanilină ($4-(HO)C_6H_3-3-(OCH_3)CHO$), grad puritate $\geq 98\%$; Clorură de sodiu, chimic pură; Ulei de olive; Apă distilată; Alcool etilic de 96%.

Prepararea reagenților:

Amestecul extractant Folch se prepară prin amestecarea a 2,0 ml cloroform distilat cu 1,0 ml alcool etilic 96% (în original metanol). Volumul final al amestecului se calculează în dependență de numărul probelor. Procedura se efectuează în condiții de ventilare.

Reagentul fosfo-vanilinic: Se cântăresc 0,75 g vanilină și se trec într-un pahar de sticlă cu volumul de 200 ml. Vanilina se dizolvă în 125 ml apă distilată. Amestecul obținut se trece într-un balon volumetric cu volumul de 500 ml, la care se adaugă acid fosforic concentrat până la cotă. Reagentul fosfo-vanilinic conține 1,2 mg vanilină în 1,0 ml acid fosforic de 68%. Reagentul se trece într-un vas din sticlă întunecată și poate fi utilizat după 48 ore de expunere la întuneric la temperatura camerei. Reagentul este valabil timp de 30 zile.

Soluția de clorură de sodiu de 0,9%: Se cântăresc 0,9 g NaCl și se trec într-un pahar de sticlă de 100 ml. Clorura de sodiu se dizolvă în 50 ml apă distilată. Amestecul se trece într-un balon cotat de 100 ml și se aduce volumul la cotă cu apă distilată.

Pregătirea probelor pentru analiză: *Extragerea lipidelor.* La sedimentul rezultat din centrifugarea a 1,0 ml biomasă de spirulină se adaugă 1,0 ml amestec extractant (cloroform și etanol în raport de 2:1). Eprubetele sunt închise cu dop și supuse agitării la temperatura camerei pentru 120 min. După expirarea timpului, din eprubete se colectează extractul lipidic (amestecul extractant) și se transferă în eprubete de sticlă. La conținutul eprubetei se adaugă 1,0 ml NaCl 0,9%. Amestecul se agită lent. Frația de alcoolul etilic cu clorura de sodiu este înlăturată. Cloroformul se înlătură prin evaporare la temperatura camerei (12 ore).

Pregătirea probelor pentru hidroliza acidă. La conținutul eprubetelor (extractul lipidic) se adaugă 1 ml acid sulfuric concentrat. Eprubetele se agită puțin și se plasează pe baia de apă la temperatura de 90 °C pentru 20 min. După expirarea timpului probele sunt răcite sub apă curentă până la temperatura camerei.

Determinarea lipidelor:

În eprubete pentru centrifugare de sticlă, se ia 0,1 ml hidrolizat la care se adaugă 3,0 ml reagent fosfo-vanilinic. Amestecul reactant este agitat și expus la întuneric, la temperatura

camerei pentru 30 min. După expirarea timpului de incubare se înregistrează absorbanta probelor la lungimea de undă de 520 nm *vis-a-vis* de proba oarbă.

Pregătirea probei oarbe. Se amestecă 0,1 ml acid sulfuric concentrat cu 3,0 ml reagent fosfo-vanilinic. Probele se expun la întuneric, la temperatura camerei pentru 30 min. După expozitie, proba este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

Pregătirea probelor standard de lipide. În calitate de standard lipidic se utilizează amestecul constituit din ulei de olive în etanol cu concentrația lipidelor de 0,0075 mg/ml. Se prepară 3 - 5 probe. La 0,1 ml amestec de lipide se adaugă 1,0 ml acid sulfuric concentrat. Probele se supun hidrolizei pe baia de apă la 90 °C timp de 20 min. După expirarea timpului, probele se răcesc sub apă curgătoare până la temperatura camerei. La 0,1 ml hidrolizat se adaugă 3,0 ml reagent fosfo-vanilinic. Amestecul reactant este agitat și expus la întuneric, la temperatura camerei pentru 30 min. După expirarea timpului de incubare se înregistrează absorbanta probelor la lungimea de undă de 520 nm *vis-a-vis* de proba oarbă utilizând aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului T60 PG *Instruments*.

Calculul conținutului cantitativ de lipide în probe se efectuează după formula:

$$C = A_{520} \times C_{st} \times 100\% / A_{st} \times m \quad (2.10)$$

unde:

C - concentrația lipidelor în probă, % biomasa absolut uscată;

A₅₂₀ - absorbanta probei experimentale la 520 nm;

A_{st} - absorbanta probei standard la 520 nm;

C_{st} - concentrația lipidelor în proba standard, mg/ml;

m - masa probei pentru analiză, mg.

2.3.6 Determinarea produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa de spirulină, testul TBARS

Principiul metodei: Determinarea produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa de spirulină prin calculul conținutului de dialdehidă malonică (DAM) în baza substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric (TBARS) este o metodă indirectă de stabilire a acumulării radicalilor liberi în biomasă. Rezultatele testului conținutului dialdehidei malonice pot fi anunțate cu specificarea timpului de incubare și a lungimii de undă pentru produsele nespecifice colorate (600 nm). În condiții de temperatură înaltă în mediul acid, dialdehida malonică reacționează cu acidul tiobarbituric (ATB) cu formarea produsului colorat în roz cu maximumul de absorbție la lungimea de undă de 523 nm [109].

Este una din metodele de determinare a statutului oxidativ al biomasei, care demonstrează, în mod indirect, deplasarea statutului redox în favoarea proceselor de reducere a radicalilor sau a proceselor de oxidare cu acumularea radicalilor liberi care induc oxidarea lipidelor. În cazul biomasei de spirulină, în care lipidele constituie 5,0% (din biomasa absolut uscată), culoarea produselor nespecifice se exclude prin înregistrarea absorbantei la 600 nm (lungimea de undă medie specifică ficocianinelor).

Reagenți: Acid tricloracetic (CCl_3COOH), Sigma-Aldrich, grad puritate > 99%; Acid tiobarbituric ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$), Sigma-Aldrich, grad puritate 98%.

Prepararea soluțiilor:

Soluția de acid tricloracetic de 20,0%. 20,0 g (masă uscată) CCl_3COOH se trec într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml și se dizolvă în apă distilată. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.

Soluția de acid tiobarbituric de 0,76%. 760,0 mg acid tiobarbituric se trece într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml. Se adaugă circa 50,0 ml acid tricloracetic de 20,0% și se plasează pe baie de apă (90 °C) până la dizolvare completă, apoi volumul soluției se aduce la cotă cu acid tricloracetic de 20%. Soluția se prepară în ziua utilizării. Volumul de lucru a acidului tiobarbituric se calculează în baza numărului de probe experimentale.

Pregătirea probelor pentru analiză: *Pregătirea probelor experimentale.* 1,0 ml probă de biomasă de spirulină (10 mg/ml) se centrifughează la 10000 rpm în eprubete Eppendorf (2,0 ml). După centrifugare supernatantul se înlătură. Biomasa sedimentată se amestecă cu 3,0 ml acid tiobarbituric (0,76%) și se trece în eprubete de sticlă.

Pregătirea probelor pentru hidroliza acidă. Amestecul reactant constituit din biomasă și acid tiobarbituric se incubează pe baie de apă la 95 °C timp de 40 min. În continuare, probele se răcesc sub jet de apă rece și se centrifughează la 3000 rpm.

Determinarea conținutului de dialdehidă malonică:

Pregătirea probelor experimentale. Supernatantul obținut în rezultatul centrifugării probelor supuse hidrolizei se transferă în eprubete de sticlă. Se înregistrează absorbanta probelor la două lungimi de undă: 523 nm și 600 nm. În calitate de probă oarbă se utilizează amestecul din care lipsește biomasa de spirulină. Pentru calculul specific al dialdehidei malonice se face diferența dintre valorile densităților optice determinate la 523 nm și 600 nm.

Pregătirea probelor oarbe. Se amestecă 0,1 ml apă distilată cu 3,0 ml acid tiobarbituric. Probele sunt utilizate în calitate de referință zero la măsurarea probelor experimentale.

Calculul conținutului de dialdehidă malonică. Absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului T60

PG Instruments. Conținutul dialdehidei malonice în biomasa de spirulină se calculează cu utilizarea coeficientului de extincție a produsului complexului DAM-ATB:

$$\text{DAM echivalent (nM cm}^{-1}\text{)} = 1000[(A_{523}-A_{600})/155] \quad (2.11)$$

unde:

A_{523} - densitatea optică a probei la 523 nm;

A_{600} - densitatea optică a probei la 600 nm;

155 - coeficientul molar de extincție al DAM la 523 nm;

1000 - coeficientul de recalcul pentru nM.

Calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul.

2.3.7 Determinarea activității antioxidante cu utilizarea radicalului ABTS^{•+}

Metoda de determinare a activității antioxidante cu aplicarea radicalului cation ABTS^{•+} (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) este un test simplu și rapid și este utilizat intens pe scară largă în screening-ul biomasei vegetale în calitate de sursă de antioxidanți, precum și pentru determinarea calității antioxidante a produselor alimentare. Are cost redus, radicalul este stabil, solubil în solvenți organici polari și nepolari [210].

Principiul metodei: Radicalul ABTS^{•+} este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) cu persulfat de potasiu. Radicalul cation ABTS^{•+} de culoare albastră, fiind utilizat în calitate de substrat, este redus prin adăugări de electroni. Soluția de ABTS^{•+} redus se decolorează. Densitatea optică maximală a soluțiilor radical și radical redus se determină la lungimea de undă de 734 nm. Intensitatea culorii corelează invers cu valorile antioxidante.

Reagenți: 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) Merk, grad puritate $\geq 97\%$; Persulfat de potasiu $K_2S_2O_8$, grad puritate 97%; Metanol, grad puritate $\geq 98\%$; Alcool etilic de 96%; Apă distilată.

Prepararea soluțiilor:

Soluția de persulfat de potasiu de 2,45 mM. Se cântăresc 33,0 mg $K_2S_2O_8$, care se trec într-un pahar de 50 ml și se dizolvă în 20 ml apă distilată. Soluția se trece în balon cotat de 100 ml, volumul se aduce la cotă cu apă distilată.

Soluția stoc a reagentului ABTS de 7 mM. Într-un balon cotat de 50,0 ml se dizolvă 192 mg ABTS, și se aduce volumul la cotă. Persulfatul de potasiu se amestecă cu soluția ABTS în proporție de 1:1. Soluția ABTS se expune la întuneric, temperatura camerei pentru 12-16 ore, timpul necesar formării ABTS radical cation.

Pregătirea probelor pentru analiză: *Prepararea extractelor hidrice.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2 ml se iau a câte 1,0 ml biomasă de spirulină standardizată (10 mg/ml), în prealabil congelată-decongelată și se centrifughează la 11000 rpm timp de 5 min. Supernatantul obținut se colectează în eprubete Eppendorf. Extractul hidric obținut este de culoare albastră sidefie. Se păstrează sub formă congelată.

Determinarea activității antioxidante:

Prepararea soluției de lucru ABTS. Soluția de lucru ABTS radical se prepară din soluția stoc de ABTS, care se dizolvă în apă distilată până la stabilizarea absorbantei de $0,700 \pm 0,020$ la lungimea de undă de 734 nm. Proba oarbă este apa distilată. Volumul soluției de lucru ABTS cation radical se calculează în baza numărului de probe.

Se utilizează aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului T60 PG Instruments.

Pregătirea probelor de lucru. Se prepară amestecul reagent în eprubete din sticlă cu volumul de 10 ml. Amestecul reagent constă din 3,0 ml soluție de lucru ABTS la care se adaugă 0,1 ml probă (extract hidric din biomasa de spirulină). Probele se agită și la intervalul de 6 min se înregistrează absorbanta la 734 nm.

Prepararea probei oarbe. Se prepară amestecul constituit din 0,1 ml extract hidric și 3,0 ml apă distilată. Proba este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

Activitatea antioxidantă a probelor experimentale se exprimă în % inhibiție ABTS care se calculează conform formulei:

$$\% \text{ Inhibiție } = (A_{t=0} - A_{t=6 \text{ min}}) / A_{t=0} \times 100\% \quad (2.12)$$

unde:

$A_{t=0}$ - absorbanta reagentului de lucru ABTS la 734 nm,

$A_{t=6 \text{ min}}$ - absorbanta amestecului reactiv după expozitia de 6 min la 734 nm.

2.3.8 Determinarea a conținutului de seleniu în biomasa de spirulină

Conținutul seleniului a fost determinat în laboratorul de Geochimie a Apelor, Institutul de Chimie, șef laborator Bogdevici Oleg, doctor în științe geologice. Determinarea conținutului de seleniu în biomasa de spirulină s-a efectuat conform GOST R51309-99 „Drinking water. Determination of elements content by atomic spectrometry methods” cu utilizarea unui spectrometru atomic cu absorbție [99]. Metoda propusă este bazată pe analiza secvențială în flăcără de aer cu acetilenă a urmelor metalice și non-metalice din eșantioanele lichide și dizolvate, ce conțin seleniu și măsurarea absorbantei flăcării (vaporilor ce conțin seleniu) în intervalul de lungimi de undă 196-207,5 nm. Determinările sunt raportate la soluția de referință

cu o concentrație cunoscută a seleniului conform „Metodei curbei de etalonare”. Sensibilitatea: 100,0 µg/l. Lungimea de undă alternativă: 196,0 nm.

Reagenți: Hidroxid de sodiu (NaOH) chimic pur; Acid azotic concentrat (HNO₃) chimic pur; Peroxid de hidrogen 30% (H₂O₂) farmaceutic; Selenit de sodiu (Na₂SeO₃) chimic pur; Acid percloric (HClO₄) chimic pur; Acetilenă ≥ 99,9%, Merk; Apă distilată.

Prepararea reagenților:

Soluția de hidroxid de sodiu de 0,1N. 0,4 g NaOH se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat cu volumul de 100 ml.

Soluția de acid azotic de 0,1N. 0,4 ml HNO₃ concentrat se dizolvă în apă distilată în balon cotat cu volumul de 100 ml.

Pregătirea probelor pentru analiză: Mineralizarea probei. Se iau câte 1,0 ml biomasă de spirulină cu concentrația de 10 mg/ml și se supune procedurii de uscare în creuzete de porțelan la temperatura 105 ± 2 °C până la masa constantă și cântărită. Probele cu biomasa uscată se trec în baloane Kjeldahl și se adaugă 0,2 ml acid azotic și 1 - 2 picături de peroxid de hidrogen de 30%. Baloanele sunt conectate la sistemul de refluxare și se expun la temperatura de 120 °C pe baia de nisip. Probele obținute se trec cantitativ cu apă distilată în eprubete de sticlă. Volumul final al probelor - 4,8 ml.

Determinarea conținutului de seleniu:

Conținutul probei demineralizate se introduce în eprubetă și peste acesta se adaugă 8,0 ml soluție hidroxid de sodiu de 0,1N și se agită minuțios, după care agitarea continuă pe un agitator timp de 60 min. În continuare probele se centrifughează la 2000 rpm timp de 10 min. Supernatantul este colectat într-o eprubetă de sticlă. La sediment se adaugă 8,0 ml soluție NaOH de 0,1N și se plasează pe un agitator pentru 8 ore. După expirarea timpului de agitare, probele se centrifughează la 2000 rpm timp de 10 min. Supernatantele se reunesc și se măsoară volumul. Amestecul obținut (pentru fiecare probă) se toarnă într-o ceașcă de porțelan care se plasează pe baia de nisip la temperatura de 60 - 80 °C și se evaporă până la siccitate. La proba uscată se adaugă 0,3 ml acid percloric concentrat și 0,15 ml acid azotic concentrat și se mineralizează proba pe baia de nisip la temperatura de 110 - 150 °C până la formarea unui reziduu de săruri umede. După răcirea probelor până la temperatura camerei, reziduuul de săruri umede se solubilizează în 5 ml HNO₃ 0,1 N și se aduce volumul soluției de analizat la 20 - 25 ml.

Procedura de măsurare a datelor se realizează conform GOST-ului respectiv.

2.3.9. Determinarea în biomasa de spirulină a conținutului de germaniu

Principiul metodei: Germaniul reacționează cu fenil-fluoronul, formând un complex colorat. Reacția are loc în mediul acid (pH-ul 0 - 1) cu viteza diminuată și mai rapid în soluția tampon acetat (pH-ul 4 - 5). Pentru majorarea sensibilității determinării cu fenil-fluoron se utilizează bromura de cetil-trimetil-amoniu (BCTA). În acest caz concentrația optimală a HCl este de 1-1,8 M. În mediu acid germaniul formează cationul $[\text{Ge}(\text{OH})_2^{2+}]$ care reacționează cu fenil-fluoronul timp de 2 - 3 min și creează un complex colorat în oranj, ce rămâne stabil până la 4 ore [167].

Reagenții: Fenil-fluoron (2,6,7-trigidroksi-9-phenyl-3 (ZN) - ksantenon; branch I, R — phenyl), Merk; Bromură de cetil-trimetil-amoniu (BCTA) $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3)$, Pharmaceutical, Merk; Dioxid de germaniu (GeO_2) chimic pur; Apă distilată; Alcool etilic de 96%; Acid clorhidric concentrat (HCl), chimic pur; Acid ascorbic ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), farmaceutic, Merk; Amoniac (NH_3); Acid azotic concentrat (HNO_3) chimic pur; Peroxid de hidrogen 30% (H_2O_2) farmaceutic.

Prepararea reagenților:

Soluția de fenil-fluoron 0,001M (0,03%). 80 mg fenil-fluoron se dizolvă în 100 ml alcool etilic, ce conține 1,0 ml HCl concentrat. Amestecul obținut se transferă într-un balon volumetric de 250 ml și se aduce până la cotă cu etanol. Soluția este stabilă timp de 30 zile.

Soluția de bromură de cetil-trimetil-amoniu (BCTA) de 0,9%. 2,25g de BCTA se dizolvă în 150 ml apă distilată pe baia de apă la 25 - 30 °C. Amestecul obținut se transferă într-un balon volumetric de 250 ml și se aduce până la cotă cu apă distilată. Soluția este stabilă timp de 30 zile.

Soluția de acid ascorbic de 10,0%. 10 g acid ascorbic se dizolvă în 50 ml apă distilată. Amestecul format se trece în balon volumetric de 100 ml și se aduce până la cotă cu apă distilată.

Soluția standard de dioxid de germaniu (1,0 mg/ml). 100 mg GeO_2 se transferă cantitativ într-un balon cotat de 100 ml cu 25 - 50 ml apă distilată și se adaugă câteva picături de amoniac până la dizolvare completă. Se aduce volumul cu apă bidistilată până la cotă. Soluția se diluiază de 1000 ori pentru a obține soluția de lucru de 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Pregătirea probelor pentru analiză: Mineralizarea probei se efectuează conform procedurii descrise în p. 2.3.8.

Determinarea conținutului de germaniu:

Pregătirea probelor de lucru. În eprubete de sticlă se iau a câte 1,6 ml probă la care se adaugă 0,2 ml acid ascorbic, 0,3 ml acid clorhidric concentrat, 0,2 ml BCTA și 0,2 ml fenil -

fluoron. Probele se agită și se supun la temperatura camerei pentru 5 min. Se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 507 nm.

Prepararea probei oarbe. În eprubete din sticlă se ia 1,6 ml apă distilată la care se adaugă 0,2 ml acid ascorbic, 0,3 ml acid clorhidric concentrat, 0,2 ml BCTA și 0,2 ml fenil-fluoron. Probele se agită și se expun la temperatura camerei pentru 5 min, după care se utilizează în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

Construirea curbei de calibrare. Din soluția standard de dioxid de germaniu cu concentrația de 1,0 mg/ml se prepară câteva diluții în intervalul de concentrații 0,05 - 1,0 μg/ml. La 1,6 ml soluție GeO₂ se adaugă 0,2 ml acid ascorbic, 0,3 ml acid clorhidric concentrat, 0,2 ml BCTA și 0,2 ml fenil-fluoron. Se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 507 nm, utilizând aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului T60 PG Instruments. Se verifică r^2 , pentru care valoarea acceptată este de 0,99. După fixarea valorii $r^2=0,99$ se obține valoarea pentru coeficientul K, utilizat în calculul cantitativ al germaniului. Formula de calcul este:

$$K=C/A_{507} \quad (2.13)$$

unde:

C - concentrația germaniului în probe, mg/ml;

A₅₀₇ - absorbanta probei la 507 nm.

Calculul conținutului cantitativ de germaniu în probe se efectuează în baza coeficientului determinat cu aplicarea formulei de calcul:

$$C = A_{507} \times k \times \eta \times 100\%/m \quad (2.14)$$

unde:

C - concentrația germaniului în probă, mg%;

A₅₀₇ - absorbanta la 507 nm;

K – coeficientul calculat din curba de calibrare, mg/ml;

η - diluția;

m - masa probei pentru analiză, mg.

Fracțiile de compuși biologic activi (aminoacizi liberi și oligopeptide, proteine, glucide, lipide) au fost obținute conform etapelor și schemei elaborate și descrise în [3].

Toate experiențele au fost realizate în trei repetări, iar rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice uzuale cu aplicarea instrumentelor statisticii descriptive (calculul mediilor aritmetice, abaterea standard, coeficientului de variație și coeficientului de

corelare). În calitate de test de semnificație – testul Student, fiind admise ca diferențe statistic veridice cele, pentru care $p < 0,05$.

2.4 Concluzii la capitolul 2

1. Tulpina tehnologică a cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) - sursă de compuși biologic activi a servit în calitate de obiect de studiu în această lucrare. Tulpina este depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.
2. În calitate de surse de seleniu la cultivarea spirulinei au fost utilizați un șir de compuși anorganici ai Se (IV), iar în calitate de surse de germaniu - compuși anorganici și organici ai Ge (IV).
3. Pentru cultivarea spirulinei în prezența compușilor seleniului și germaniului a fost utilizat ca bază mediul Zarrouk și variante de compoziție a acestuia, adaptate la condițiile experimentale.
4. Metodele clasice și moderne, selectate pentru realizarea lucrării sunt proceduri adaptate tulpinii de spirulină utilizată și sarcinilor puse în fața lucrării și se referă la: determinarea cantității de biomasă și conținutului de seleniu și germaniu în aceasta; evaluarea cantității unor compuși biologic activi în biomasă; testele de apreciere a siguranței biomasei de spirulină obținute la cultivare în prezența compușilor seleniului și germaniului și analiza statistică a rezultatelor obținute.

3. ELABORAREA BIOTEHNOLOGIEI DE OBȚINERE A PREPARATELOR CU CONȚINUT SPORIT DE SELENIU ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ

Cercetările efectuate de noi, precum și de alți cercetători la nivel mondial până în prezent demonstrează, că cianobacteria *Arthrospira platensis* (spirulina) corespunde tuturor criteriilor, care permit a o include în calitate de obiect-cheie al tehnologiilor de obținere a biomasei îmbogățite cu microelemente, iar în baza ei a diverselor preparate cu conținut sporit de acestea.

Pentru a obține o biomasă de spirulină îmbogățită cu seleniu, iar în baza ei, a preparatelor cu conținut sporit de acest microelement, cercetările reflectate în această parte a lucrării au fost organizate și realizate conform design-ului prezentat în figura 3.1.

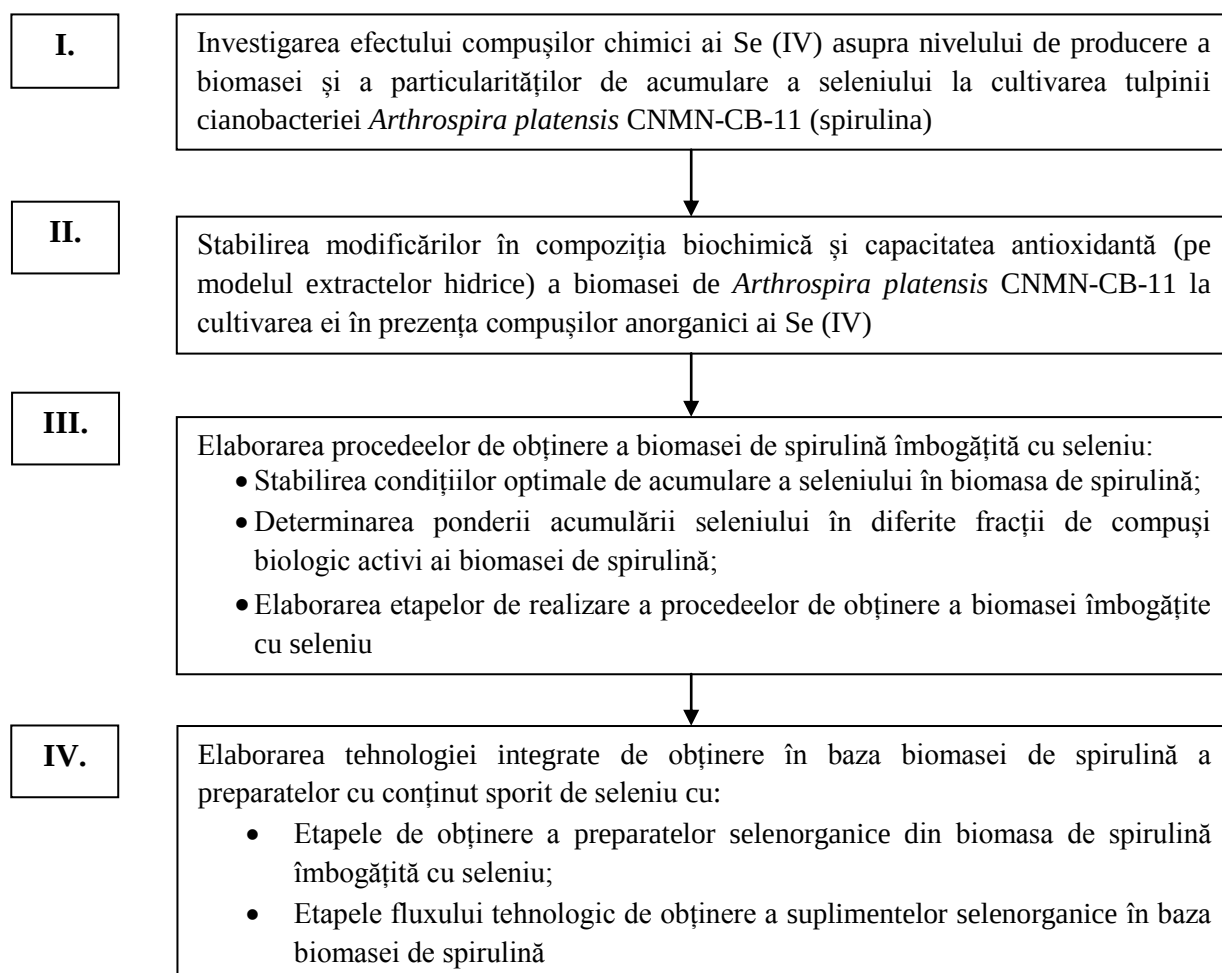


Fig. 3.1. Design-ul cercetărilor realizate în vederea elaborării tehnologiei de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu în baza biomasei de spirulină

3.1. Efectul unor compuși anorganici ai Se (IV) asupra producerii de biomasă, acumulării seleniului și compoziției biochimice a tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina)

Răspunsul microalgelor și cianobacteriilor la prezența seleniului în habitat este unul particular și depinde atât de cantitatea, cât și de forma lui moleculară. Aceste organisme nu numai că absorb seleniul pe suprafața sa, ci și îl încorporează, în special, în compoziția compușilor cu greutate moleculară înaltă (proteine, polizaharide, lipide). Rata de acumulare din diferite forme moleculare și nivelul de „încorporare” de către microalge și cianobacterii a seleniului depinde de particularitățile morfo-funcționale a lor, de concentrația și gradul de oxidare a seleniului, de prezența în mediu a sulfatilor și metalelor grele, de temperatură, pH și alți factori ai mediului [29, 97, 206, 220 - 221, 285, 290, 300, 320].

Căile metabolice de asimilare a seleniului în celulele algale (figura 3.2) se derulează în modul următor:

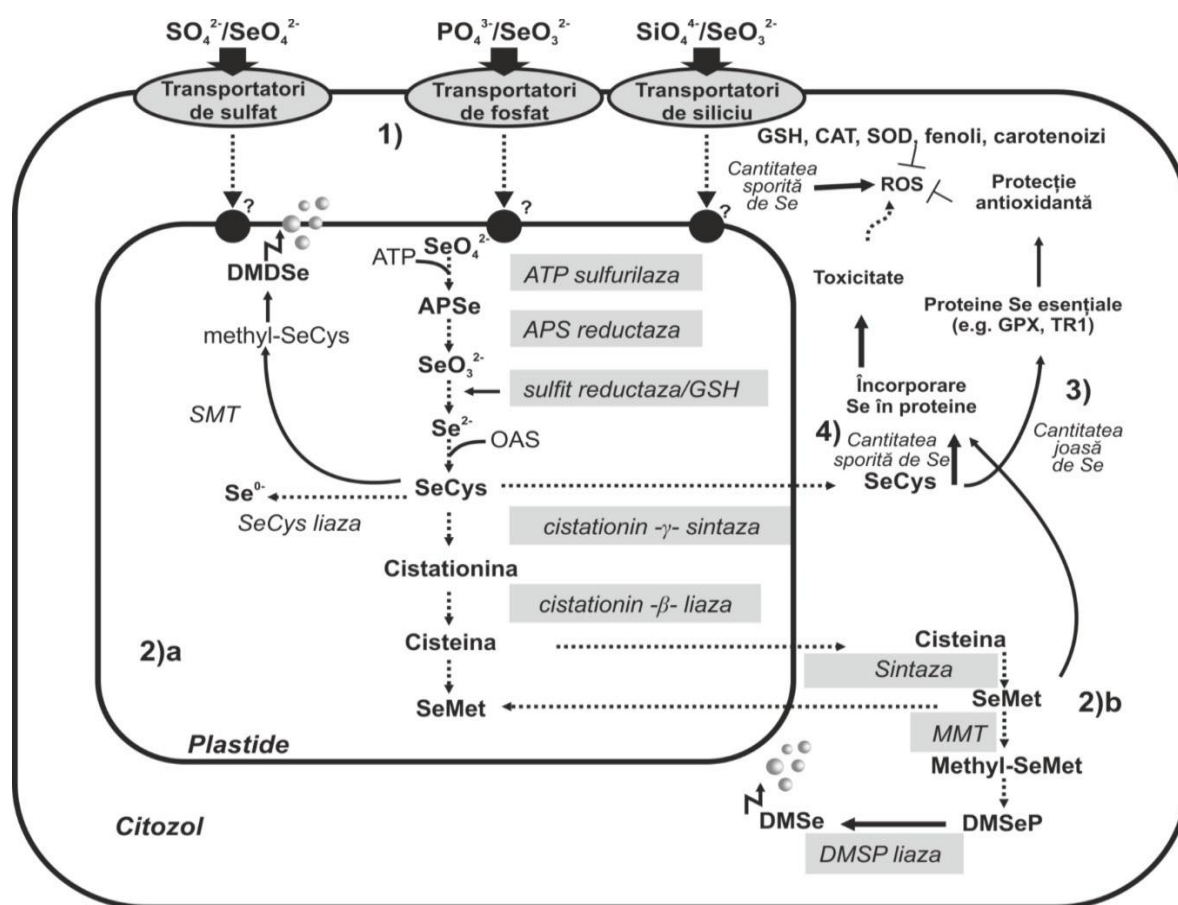


Fig. 3.2. Metabolismul seleniului în celulele algale [221]

- 1) Absorbția seleniului prin intermediul transportatorilor de sulfat, fosfat și siliciu;
- 2) Asimilarea seleniului/sulfurului (similar sulfurului): APSe (fosfoselenat de adenzină); GSH (glutathion); OAS (O-acetilserină); Se-Cys: (selenocisteină); Se-Met: (selenometionină); MMT (metilmetionină metiltransferază); DMSeP (dimetilselenopropionat); DMD Se (dimetil (di) selenură, volatilă); SMT (selenocisteină metiltransferază);
- 3) Incorporarea Se-Cys în Se-proteinele esențiale care joacă un rol-cheie în sistemele de protecție antiradicalică;
- 4) Incorporarea Se-aminoacizilor în alte proteine nespecifice în cazul când concentrația intracelulară de Se este înaltă. În acest caz se produc structuri malformate, ceea ce poate cauza toxicitate prin producția crescută de specii reactive ale oxigenului, pe care algele încearcă să le elimine prin îmbunătățirea sintezei compușilor antioxiđanți enzimatici și non-enzimatici [221].

Reacția specifică a diferitor specii de spirulină (*S. maxima*, *S. platensis*, *S. subsalsa*) la prezența seleniului în mediul său de creștere, precum și nivelurile de acumulare ale acestui microelement de către celulele cianobacteriene sunt descrise în mai multe studii [115, 154, 278, 280, 291, 293, 322]. S-a demonstrat, spre exemplu, că concentrațiile mai mici de 400 mg/l de selenit de sodiu stimulează creșterea spirulinei, iar acest efect este cel mai pronunțat în intervalul concentrațiilor de 5 - 40 mg/l [154]. Concentrațiile compusului de peste 500 mg/l sunt deja toxice pentru cultura de spirulină. Conform rezultatelor unui alt studiu, concentrația maximală admisibilă de selenit de sodiu în mediul de creștere al spirulinei nu trebuie să depășească 170 mg/l, iar toxicitatea posibilă a Se (IV) pentru *S. platensis* depinde și de pH-ul mediului de cultivare, și de conținutul ionilor sulfizi [322]. În același timp, nivelurile ridicate de Se (IV) în mediul de cultivare, induc o reacție de protecție a celulei, care constă, la prima etapă, în adsorbția selenitului de către exopolizaharidele secretate, urmată de reducerea elementului la valența zero (elementul „gri” sau „roșu”, care nu este nici toxic, dar nici biodisponibil) [115, 154, 322]. Procesul este însoțit de apariția unei nuanțe roșii în mediul de cultivare, iar la concentrațiile înalte de seleniu, biomasa spirulinei dobândește o nuanță roșietică neobișnuită. Aceste rezultate ar trebui, desigur, să fie luate în considerare la optimizarea proceselor pentru producerea industrială de biomasă de spirulină îmbogățită cu seleniu.

La testarea efectului concentrațiilor toxice de selenit de sodiu (IV) (de peste 20 mg/l) asupra *S. maxima*, s-au obținut dovezi directe ale participării seleniului la eliminarea radicalilor hidroxilici în celulele cianobacteriene. În cazul creșterii conținutului de seleniu peste limita specificată, a fost observată o intensificare a peroxidării lipidelor, prin valorile crescute de dialdehidă malonică, scăderea conținutului de lipide totale, a carotenoizilor, acizilor grași polinesaturați și creșterea proporției de acizi grași saturați. Concentrații scăzute de selenit (până

la 20 mg/l) au stimulat formarea clorofilei *a*, în timp ce o creștere a nivelului de seleniu în mediul nutritiv a dus la inhibarea sintezei acestui pigment [293]. Compușii Se (VI), spre deosebire de compușii Se (IV), sunt toxici pentru spirulină și inhibă semnificativ creșterea acesteia chiar și la concentrații foarte joase [322].

Astfel, pentru spirulina/*Arthrospira platensis*, ca și pentru alte specii cianobacteriene și microalgale, seleniul în concentrații mici este un microelement necesar, iar în concentrațiile mai înalte devine toxic stopând creșterea și dezvoltarea ei. Nivelul de acumulare al seleniului în celulele acestei specii de spirulină și toxicitatea lui pentru ea, la fel, depinde și poate varia în funcție de particularitățile morfo-funcționale a tulpinilor sale și, desigur, este în raport cu concentrația și gradul de oxidare a seleniului, prezența în mediu a sulfatilor și altor metale, temperatura, pH-ul, dar și alți factori.

Compușii chimici, în cazul nostru – compușii seleniului și concentrațiile lor trebuie selectați astfel, încât să nu perturbeze procesul de creștere și dezvoltare a tulpinii de spirulină selectată pentru cercetare asigurând un nivel bun de producere al biomasei, iar capacitatea ei de a acumula seleniul nu trebuie să afecteze compoziția biochimică valoroasă a biomasei obținute, și ca urmare toate proprietățile sale benefice.

3.1.1 Cantitatea de biomasă și conținutul de seleniu acumulat la cultivarea A. platensis CNMN-CB-11 în prezența unor compuși anorganici ai Se (IV)

În testare au fost implicați 6 compuși ai Se (IV), care au fost utilizați în diferite intervale de concentrații. Astfel, Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ și $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ au fost adăugați la mediul de cultivare al spirulinei în concentrațiile: 10, 20, 30, 40 și 50 mg/l; compușii ZnSeO_3 și GeSe_2 - în concentrațiile: 5, 10, 15, 20, 25, 30 mg/l; iar compusul CoSeO_3 - în concentrațiile: 5, 10, 15 și 20 mg/l. Concentrațiile respective au fost selectate în baza unui screening primar, orientat spre stabilirea limitelor de toxicitate a compușilor respectivi pentru tulpina utilizată de spirulină.

În figura 3.3 sunt redate nivelurile de producere a biomasei și cantitatea de seleniu acumulat de către tulpina *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivarea ei în prezența compușilor anorganici ai Se (IV).

Rezultatele obținute demonstrează, că nivelul de acumulare a biomasei depinde de natura și concentrația compusului seleniului introdus în mediul de cultivare al spirulinei. S-a stabilit, că compușii Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ și $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ au fost mai puțin toxici pentru cultură decât ZnSeO_3 , GeSe_2 și CoSeO_3 . La introducerea în mediul de cultivare a spirulinei a compușilor Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ și $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ s-a observat următoarea regularitate: cu majorarea concentrației compusului, crește și conținutul de biomasă. Pentru toate concentrațiile aplicate,

valorile cantității de biomasă au fost mai mari decât în martor, cu excepția selenitului de sodiu și a selenitului de amoniu pentru care a fost stabilită o tendință de reducere foarte nesemnificativă (cu 2 - 6% în cazul concentrației de 10 mg/l) a conținutului de biomasă produsă. Cel mai înalt nivel de creștere a biomasei (cu 20,22 și 25,44%, respectiv) a fost stabilit, de asemenea, în prezența selenitului de amoniu și a selenitului de sodiu la concentrația lor maximală în mediul nutritiv de 50 mg/l [9]. În ceea ce privește compusul $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, nivelul de biomasă produsă a crescut cu 13,84%, în comparație cu martorul [75].

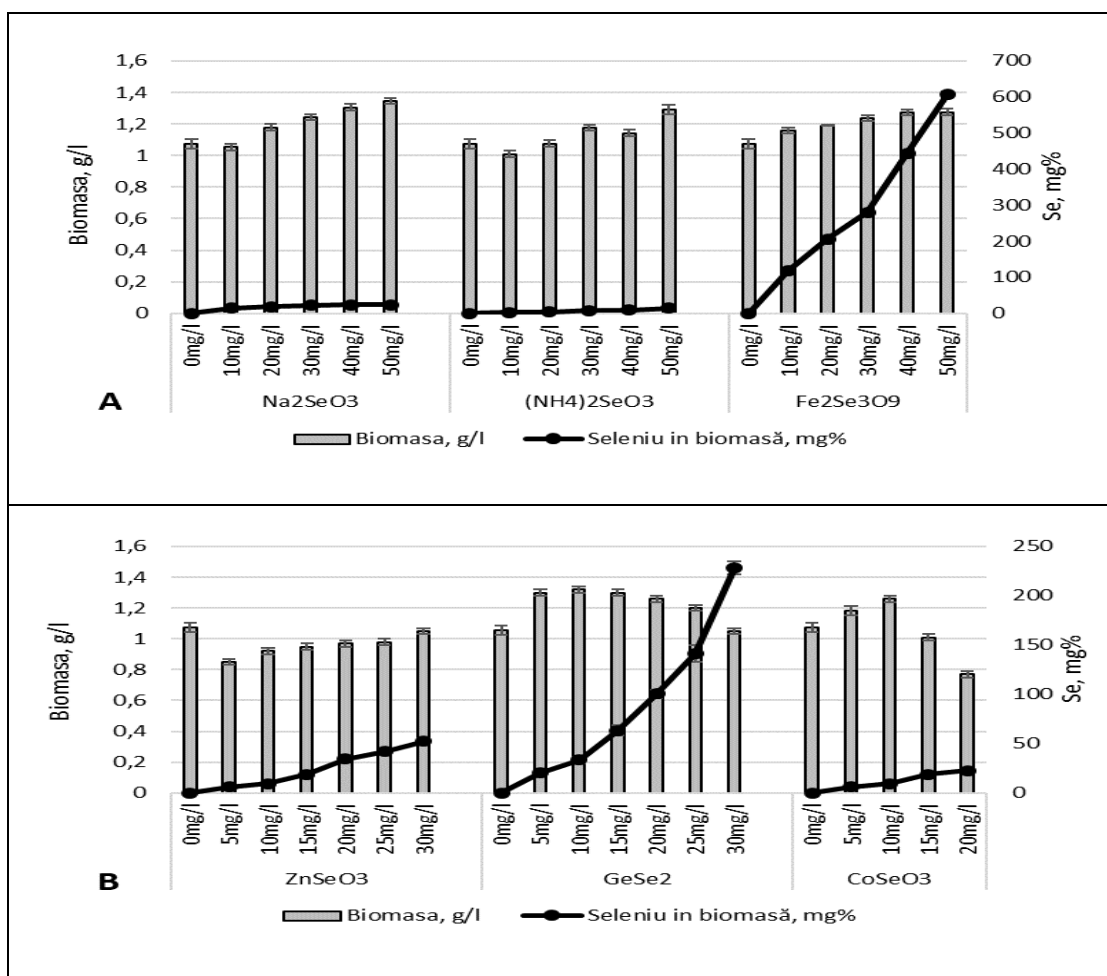


Fig. 3.3. Cantitatea de biomasă (g/l) și conținutul de seleniu acumulat (mg%) la cultivarea *A. platensis* CNMN-CB-11 în prezența compușilor: A - Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$, $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și B - ZnSeO_3 , GeSe_2 , CoSeO_3

La cultivarea spirulinei în prezența GeSe_2 , au fost determinate concentrațiile (de la 5 la 25 mg/l) pentru care nivelurile de biomasă produsă au fost mai sporite, comparativ cu martorul. Concentrația de 30 mg/l a menținut cultura în limita martorului. În concentrația de 10 mg/l,

selenura de germaniu a stimulat creșterea spirulinei, cantitatea de biomasă produsă constituind 1,32 g/l, ceea ce este cu 25,36% mai mult comparativ cu matorul.

Doar două dintre concentrațiile studiate de selenit de cobalt, de 5 mg/l și de 10 mg/l nu au avut un efect toxic asupra culturii de spirulină, conținutul de biomasă produs fiind mai mare cu 10 - 17,4% în comparație cu matorul. Concentrațiile de peste 10 mg/l ale CoSeO_3 au dus la o scădere vizibilă a producerii de biomasă (cu 28,4% în cazul concentrației de 20 mg/l).

Selenitul de zinc a manifestat asupra creșterii spirulinei un efect moderat toxic. În intervalul de concentrații 5 - 30 mg/l, producerea de biomasă de către spirulina a avut un caracter ondulator, cu o diminuare mai moderată, sau mai pronunțată sub limita matorului, a valorilor obținute [17].

În biomasa obținută la cultivarea spirulinei în prezența compușilor seleniului testați, a fost determinat conținutul lui acumulat în biomasă, evaluat în mg Se în 100 g biomasă (mg%). În lipsa compușilor seleniului, suplimentați la mediul de cultivare, în biomasa de spirulină a fost determinat un conținut de 0,161 mg% seleniu (figura 3.3).

Nivelurile acumulate de seleniu în biomasa de spirulină, prezintă, în toate variantele experimentale, valori înalte și foarte ridicate, comparativ cu biomasa de spirulină crescută în lipsa seleniților și selenurii, utilizați în cercetare.

Cel mai mare conținut de seleniu în biomasa de spirulină a fost obținut în prezența GeSe_2 și $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, în concentrațiile maxime de 30 și 50 mg/l, conținutul de seleniu fiind între 228,27 mg% și 606,9 mg% respectiv. În ceea ce privește alți compuși, nivelul acumulării de seleniu în prezența lor este mult mai diminuat [58].

Cele mai mici niveluri de seleniu acumulat în biomasă au fost stabilite în variantele cu aplicarea compușilor $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ și Na_2SeO_3 . Procesul de acumulare a seleniului de către spirulina cultivată în prezența acestor compuși are o dinamică lentă, iar conținutul acumulat este de 14,4 și 24,2 mg%, respectiv pentru concentrația lor de 50 mg/l. La cultivarea spirulinei în prezența selenitului de zinc, nivelul de acumulare a seleniului în biomasă crește odată cu majorarea concentrației compusului în mediul de cultivare. La concentrația de 30 mg/l se determină conținutul cel mai mare, de circa 52 mg% seleniu în biomasă.

Astfel, conținutul de seleniu acumulat în biomasă depinde de concentrația compusului, și până la o anumită concentrație - de cantitatea de seleniu introdusă în mediul de cultivare (tabelul 3.1).

Analizând conținutul de seleniu acumulat în biomasa de spirulină în raport cu cantitatea lui introdusă din concentrația compusului aplicat s-au observat următoarele. Pentru seleniții de sodiu, de amoniu și de fier, concentrația de 10 mg/l presupune 3,9 - 4,8 mg/l seleniu în mediul de

cultivare. Ionii de sodiu, amoniu și fier sunt parte componentă a mediilor de cultivare a spirulinei. Cu toate acestea, cultura de spirulină acumulează în mod diferit seleniul din compuși. În varianta cu aplicarea selenitului de amoniu în concentrația de 10 mg/l (4,8 mg/l Se), conținutul seleniului în biomasă este de 2,15 mg%, iar pentru 10 mg/l selenit de sodiu (4,6 mg/l Se) se acumulează 14,93 mg% seleniu.

Tabelul 3.1. Conținutul de seleniu, adăugat la mediul de cultivare (în dependență de concentrația compusului) și seleniul acumulat în biomasa de spirulină

Compusul Se		10 mg/l	20 mg/l	30 mg/l	40 mg/l	50 mg/l	
Na ₂ SeO ₃	<i>Se mg/l mediu</i>	4,57	9,13	13,70	18,27	22,83	
	<i>Se mg% biomasă</i>	14,93	18,74	22,13	23,77	24,16	
(NH ₄) ₂ SeO ₃	<i>Se mg/l mediu</i>	4,85	9,69	14,54	19,39	24,23	
	<i>Se mg% biomasă</i>	2,15	3,47	8,17	9,38	14,44	
Fe ₂ Se ₃ O ₉ ·6H ₂ O	<i>Se mg/l mediu</i>	3,94	7,89	11,83	15,77	19,71	
	<i>Se mg% biomasă</i>	118,20	206,20	279,90	443,74	606,89	
Compusul Se		5 mg/l	10 mg/l	15 mg/l	20 mg/l	25 mg/l	30 mg/l
ZnSeO ₃	<i>Se mg/l mediu</i>	2,05	4,11	6,16	8,21	10,26	12,32
	<i>Se mg% biomasă</i>	6,07	9,51	19,03	34,43	41,83	52,64
GeSe ₂	<i>Se mg/l mediu</i>	3,42	6,85	10,28	13,71	17,13	20,56
	<i>Se mg% biomasă</i>	20,36	33,39	63,26	100,63	141,30	228,26
CoSeO ₃	<i>Se mg/l mediu</i>	2,12	4,25	6,37	8,49	-	-
	<i>Se mg% biomasă</i>	6,33	9,51	19,03	22,71	-	-

Conținutul de 14,44 mg% seleniu în biomasă se acumulează la concentrația selenitului de amoniu de 50 mg/l. Creșterea concentrației selenitului de sodiu de 5 ori a dus la creșterea de 1,6 ori a seleniului acumulat în biomasă, iar pentru 50 mg/l selenit de amoniu sporul conținutului de seleniu determinat în biomasa spirulinei a fost de 6,7 ori. Pentru 10 mg/l selenit de fier hexahidrat (3,9 mg/l Se) a fost stabilit conținutul de 118,2 mg% seleniu, valoare care este de 55 ori mai mare, comparativ cu concentrația similară de selenit de amoniu și de 8 ori, comparativ cu selenitul de sodiu. Creșterea concentrației selenitului de fier hexahidrat de 5 ori a dus la creșterea de 5 ori a seleniului acumulat în biomasa spirulinei.

În experiențele cu aplicarea selenitului de zinc conținutul maximal de seleniu de 52,64 mg% în biomasă a fost determinat pentru concentrația de 30 mg/l compus în mediul de cultivare. Creșterea de 6 ori a concentrației compusului de la 5 mg/l la 30 mg/l a dus la creșterea de 8,7 ori a conținutului seleniului acumulat în biomasă.

Pentru selenitul de cobalt, conținutul maximal de 22,71 mg% seleniu în biomasă a fost determinat la concentrația compusului de 20 mg/l. Concentrația de 5 mg/l selenit de cobalt (2,12 mg/l Se) a indus acumularea a 6,33 mg% seleniu, valoare similară (6,07 mg%) pentru aceeași concentrație a selenitului de zinc (2,05 mg/l Se). Valori mari ale seleniului acumulat în biomasă au fost stabilite pentru selenura de germaniu. Concentrația de 5 mg/l selenură de germaniu (3,5 mg/l Se) a indus acumularea a 20,36 mg% seleniu. Creșterea concentrației selenurii de germaniu de 6 ori a dus la creșterea de 11 ori a seleniului acumulat în biomasă.

Analiza corelațională a confirmat dependența nivelului de acumulare a seleniului în biomasa de spirulină de concentrația introdusă a compusului. Între aceste două variabile a fost stabilită o corelare direct proporțională (tabelul 3.2).

Tabelul 3.2. Corelarea dintre concentrația compusului seleniului și cantitatea acumulată de seleniu în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11

Nº	Compusul Se(IV) mg/l	Coeficientul de determinare, R^2	Coeficientul de regresie r^2
1.	Na_2SeO_3	0,9115	0,95
2.	$(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$	0,9520	0,98
3.	ZnSeO_3	0,9786	0,99
4.	CoSeO_3	0,9507	0,97
5.	GeSe_2	0,9263	0,96
6.	$\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,9709	0,98

Astfel, toți cei șase compuși testați contribuie, într-o măsură mai mare sau mai mică, la îmbogățirea biomasei de spirulină cu seleniu. În ceea ce privește producerea de biomasă, au fost stabilite concentrațiile cu efect de stimulare și inhibiție. Dintre compușii anorganici ai seleniului, se evidențiază $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și GeSe_2 care contribuie cel mai mult la îmbogățirea biomasei de spirulină cu seleniu, având un efect favorabil și asupra productivității culturii.

3.1.2 Compoziția biochimică a biomasei de *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența unor compuși anorganici ai Se (IV)

Valoarea funcțională înaltă a biomasei de spirulină este determinată de compoziția ei biochimică unică. Spirulina are un metabolism foarte labil iar sinteza și respectiv conținutul

compușilor săi biologic activi pot fi dirijate. O parte din compușii biologic activi ai spirulinei conțin grupuri funcționale care-i permit de a metaboliza bioelemente importante. În calitate de surse de bioelemente sunt utilizate diverse forme/compuși chimici anorganici sau coordinați. Aceștia din urmă intervin și în procesele biosintetice ale culturii. Pentru ca biomasa de spirulină îmbogățită cu seleniu să-și păstreze proprietățile sale benefice, este important ca și valoarea compoziției ei biochimice să nu fie diminuată la prezența seleniului în cantități peste limitele lui fiziologice pentru cultură. În acest caz am considerat important de a stabili, în ce măsură compușii seleniului utilizați pe rol de sursă de seleniu influențează și procesele biochimice, și ca urmare conținutul unor compuși biologic activi în biomasa de spirulină, în special a compușilor care încorporează în structurile sale seleniul acumulat.

Spirulina este, în primul rând, o sursă de proteine. Conținutul de proteine variază între 55-70% și poate fi considerat un indicator important al siguranței biomasei. Conținutul de proteine se poate modifica în celulă în dependență de vârsta culturii, de acțiunea factorilor nocivi, inclusiv a compușilor care se adaugă la mediul de cultivare. S-a demonstrat, spre exemplu, că unii compuși coordinați ai Zn(II) și Cr(III), suplimentați la mediul de cultivare induc sinteza proteinelor în biomasa spirulinei, conținutul cărora crește cu 20% [58].

Referitor la efectul unor compuși ai seleniului asupra sintezei proteinelor în celulele *A. platensis* există date contradictorii. Pronina și colab. (2002) au relatat date despre inhibiția sintezei proteinelor în prezența a 10 mg/l selenit de sodiu. Cercetătorii chinezi Huang Z. (2006) și Yuhui Q. (2000) din contra, au prezentat rezultate de creștere a conținutului de proteine la aceeași concentrație a aceluiași compus [114, 280, 322].

După caracterul acțiunii asupra dinamicii acumulării proteinelor, compușii seleniului testați în această lucrare pot fi divizați convențional în două grupuri: 1) compușii a căror concentrații sporite mențin sau intensifică nivelul de sinteză al proteinelor – Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ și $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (figura 3.4A). și 2) compușii a căror concentrații mari inhibă sinteza proteinelor - ZnSeO_3 , GeSe_2 și CoSeO_3 (figura 3.4B).

În prezența compusului Na_2SeO_3 , odată cu creșterea concentrației lui în mediul de cultivare, spirulina și-a menținut nivelul de sinteză al proteinelor, conținutul lor în biomasă fiind cu 2,8 - 7,7% mai înalt, pe fonul unei acumulări neînsemnate, până la 24 mg% de seleniu.

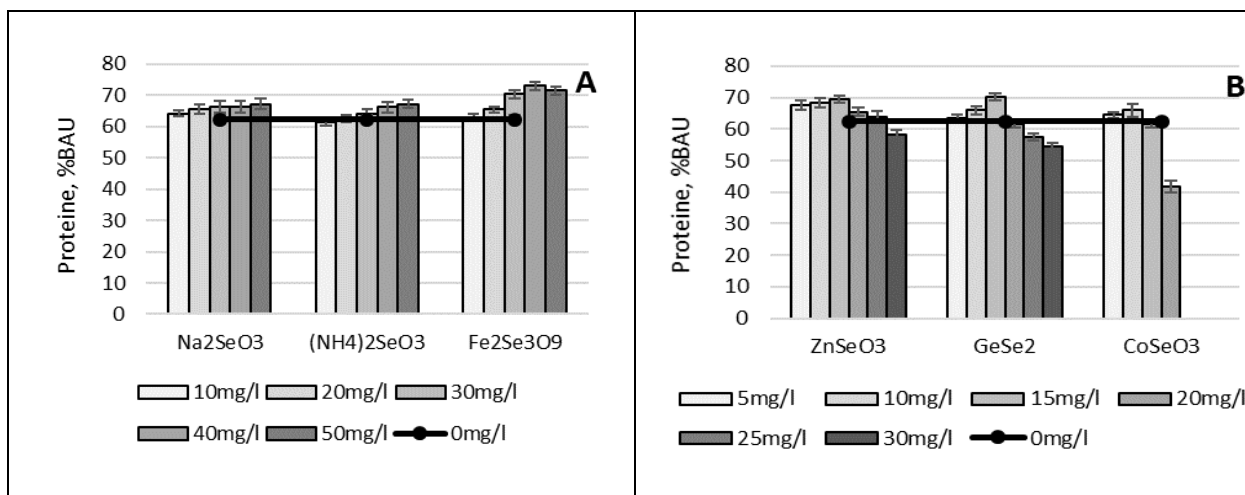


Fig. 3.4. Conținutul de proteine (% BAU) în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na₂SeO₃, (NH₄)₂SeO₃, Fe₂Se₃O₉·6H₂O și B - ZnSeO₃, GeSe₂, CoSeO₃

Un efect similar a fost caracteristic și pentru selenitul de amoniu, pentru care la concentrația de 50 mg/l a fost determinat un spor cu 8% al conținutului de proteine, pe fonul unei cantități de seleniu acumulate de 14,44 mg%. O acumulare a proteinelor 17% mai mult față de martor, a fost stabilită pentru concentrația de 40 mg/l selenit de fier hexahidrat. Pentru această concentrație a fost obținută o acumulare de seleniu de 443,7 mg% în biomasă. Acumularea maximală de Se - 606,9 mg% a fost obținută la concentrația selenitului de fier hexahidrat de 50 mg/l, pentru care conținutul proteinelor a crescut cu circa 14%, comparativ cu martorul.

Compusul ZnSeO₃, în intervalul de concentrații 5 - 25 mg/l, a influențat pozitiv sinteza proteinelor la spirulina. Conținutul maximal de proteine în biomasă, de 69,5% (cu 11,5% mai mult în comparație cu martorul) pe fonul unei cantități de seleniu acumulate de circa 19 mg%, a fost stabilit pentru concentrația de 15 mg/l. Cu creșterea concentrației compusului în mediul de cultivare, s-a observat o tendință de reducere a conținutului de proteine. La concentrația de 25 mg/l, nivelul de acumulare al proteinelor de către spirulina a fost similar martorului. La concentrația de 30 mg/l, s-a produs o scădere nesemnificativă a conținutului de proteine în biomasa spirulinei. Conținutul de seleniu acumulat în biomasă, la concentrația selenitului de zinc de 25 mg/l și 30 mg/l este de 41,83 și 52,64 mg%, respectiv. Este de menționat faptul, că conținutul de proteine determinat la concentrația de 15 mg/l selenit de zinc, este similar variantei cu aplicarea selenitului de fier hexahidrat în concentrație de 30 mg/l. Conținutul seleniului acumulat în biomasă diferă însă, semnificativ - între 19,03 mg% pentru ZnSeO₃ și 279,9 mg% în cazul Fe₂Se₃O₉·6H₂O.

Pentru GeSe_2 , cel mai înalt conținut de proteine a fost stabilit la concentrația de 15 mg/l, constituind în biomasa de spirulină 70,33%, ceea ce este cu 12,6% peste nivelul martorului. Conținutul seleniului în biomasă pentru această concentrație este de 100,63 mg%. La concentrațiile de 25 și 30 mg/l selenură de germaniu, sinteza proteinelor s-a redus cu 8% și cu 13%, conținutul seleniului acumulat fiind de 141,5 mg% și de 288,27 mg%, respectiv. În intervalul de concentrații 20 - 30 mg/l, selenura de germaniu nu a afectat semnificativ sinteza proteinelor, dar a favorizat procesul de acumulare a seleniului în biomasa spirulinei.

În cazul CoSeO_3 în concentrații mai diminuate nu a fost observată o stimulare semnificativă a sintezei de proteine. Pentru concentrația de 20 mg/l selenit de cobalt, valoarea proteinelor a scăzut cu 23% față de martor, constituind 41,87% pe fondul unei cantități de 22,71 mg% seleniu în biomasă.

Prin urmare, toți compușii testați, în funcție de natura și concentrația lor, influențează sinteza proteinei în cultura de spirulină. Este de remarcat compusul $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, care la concentrația de 40 mg/l a stimulat cu 17% sinteza proteinelor și o acumulare de 443,7 mg% seleniu [75]. Din punctul de vedere al producerii de biomasă și acumulării semnificative de seleniu, acest compus poate fi introdus în tehnologiile de obținere de biomasă cu un conținut apreciabil de proteine și îmbogățită cu seleniu. În baza a trei indicatori (conținutul de biomasă, cantitatea de seleniu acumulată de 63 mg% și conținutul de proteine de 70,33%), a fost evidențiat un alt compus al seleniului - GeSe_2 , care, la fel, poate fi utilizat pentru a produce biomasă cu un conținut ridicat de proteine și îmbogățit cu seleniu și germaniu.

Un alt indicator, la fel de important, care determină valoarea biologică a spirulinei este conținutul de ficobiliproteine. Ficobiliproteinele joacă un rol important în mecanismul fotosintetic al celulei. Conținutul lor în biomasă se reduce semnificativ la prezența în mediul de cultivare a unor compuși chimici cu efect toxic [55].

Conținutul de ficobiliproteine în celule constituie 60% din masa tuturor proteinelor hidrosolubile sau 20% din masa uscată [199]. Ficobiliproteinele sunt primele proteine cianobacteriene obținute în formă pură. Se cunosc trei clase de ficobiliproteine: 1) aloficocianina; 2) ficocianinele incluzând ficoeritrocianina și 3) ficoeritrinele. În spirulină, ficobiliproteinele sunt reprezentate de ficocianină și aloficocianină. Adesea, ficocianina este considerată principalul marker biologic al spirulinei [153, 236 - 237].

Efremova și colab. (2012) au demonstrat că unele complexe metalice ale Mn (II) și Zn (II) afectează conținutul de ficocianină în biomasa spirulinei [310]. Unii autori au stabilit însă, efectul stimulator al seleniului asupra sintezei ficobiliproteinelor și fixarea lui în structura ficocianinei [55, 114].

Toți compușii anorganici ai Se (IV) testați în această lucrare au influențat pozitiv dinamica acumulării ficobiliproteinelor la tulpina de spirulină inclusă în studiu (figura 3.5).

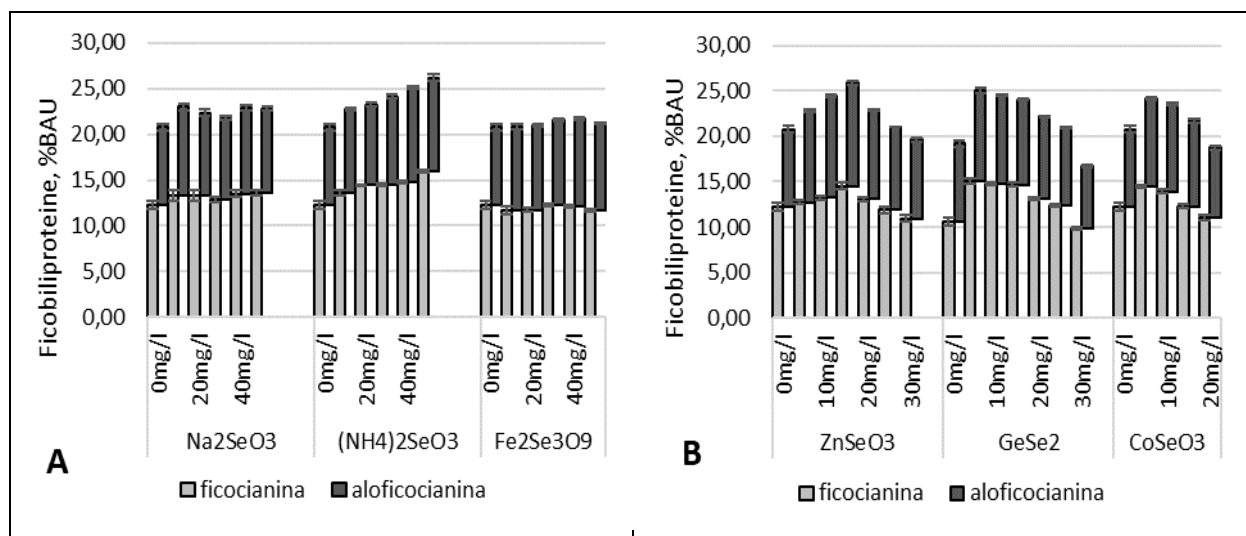


Fig. 3.5. Conținutul de ficobiliproteine (% BAU) în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na₂SeO₃, (NH₄)₂SeO₃, Fe₂Se₃O₉·6H₂O și B - ZnSeO₃, GeSe₂, CoSeO₃

Cea mai mare creștere a conținutului de ficobiliproteine, cu 30,5%, comparativ cu matorul, a fost determinată la suplimentarea selenurii de germaniu în concentrația de 5 mg/l. Prezența în mediul de cultivare a selenitului de amoniu în concentrația de 50 mg/l și a selenitului de zinc în concentrația de 15 mg/l, a condus la o creștere a conținutului de ficobiliproteine cu 26,1% și, respectiv, cu 24,4%. În cazul selenitului de cobalt cea mai mare creștere a conținutului de ficobiliproteine - cu 16,3% comparativ cu matorul, a fost stabilită la concentrația de 5 mg/l compus. Selenitul de sodiu a fost mai inert în ceea ce privește implicarea lui în stimularea sintezei ficobiliproteinelor. Selenitul de fier hexahidrat, compus al seleniului care a favorizat sinteza proteinelor și acumularea seleniului în biomasa de spirulină, nu a afectat și nici nu a stimulat sinteza ficobiliproteinelor, conținutul lor fiind unul relativ stabil pentru toate concentrațiile compusului.

Compușii testați au stimulat într-o măsură mai mare sinteza ficocianinei de către spirulina, conținutul maximal al căreia coincide cu acumularea maximală de ficobiliproteine (figura 3.5). Excepție prezintă selenitul de zinc și selenitul de fier hexahidrat, compuși care au demonstrat o acțiune stimulatorie mai pronunțată asupra sintezei aloficocianinei. Cel mai înalt nivel de creștere a conținutului de ficocianină (cu 41,8% față de mator) s-a determinat în biomasa produsă la cultivarea spirulinei în prezența a 5 mg/l selenură de germaniu. Cel mai înalt

conținut de aloficocianină s-a înregistrat în biomasa obținută la cultivarea cianobacteriei în prezența a 15 mg/l selenit de zinc [5].

Rezultate similare au fost raportate de către Huang și col. (2006) care au înregistrat o creștere cu 12% a conținutului de ficocianină și cu 15% a cantității de aloficocianină la cultivarea spirulinei în prezența a 10 mg/l Na_2SeO_3 [114]. În cazul nostru, suplimentarea a 10 mg/l selenit de sodiu a condus la stimularea sintezei ficocianinei cu 6% și a aloficocianinei cu 7%, rezultat datorat probabil, reacției specifice a tulpinii de spirulină selectate de noi, în condiții similare de cultivare.

Selenitul de fier hexahidrat, compus al seleniului care a favorizat sinteza proteinelor și acumularea seleniului în biomasa de spirulină, nu a afectat și nici nu a stimulat sinteza ficobiliproteinelor, conținutul lor fiind unul relativ stabil pentru toate concentrațiile compusului [75].

Cel de al treilea indicator, la fel de important, care reflectă calitatea biomasei de spirulină este conținutul de glucide. Conținutul de glucide variază între 10 și 20% în biomasa de spirulină. Aproximativ 50% din glucide sunt polizaharide, cum ar fi pectina și hemicelulozele.

Literatura de specialitate oferă date despre efectele unor compuși coordinativi ai microelementelor asupra conținutului de glucide. Astfel, compușii coordinativi ai Zn (II) cu monocloracetat și monobromacetat în concentrațiile de 5 mg/l și 20 mg/l sporesc cu 14,77% - 9,44% conținutul de glucide în biomasa de spirulină. Compușii coordinativi ai Fe (III) cu alanina, valina și glicina în concentrații de până la 50 mg/l stimulează sinteza glucidelor, sporind în medie cu 50% conținutul lor, iar compușii coordinativi ai Cr (III) dublează conținutul de glucide în biomasa de spirulină [12, 58]. O creștere semnificativă a conținutului de glucide în biomasa de spirulină a fost stabilită și în prezența unor concentrații mari de NaCl, ceea ce se explică prin faptul că spirulina dezvoltă mecanisme de protecție în condiții de stres [39].

Dinamica modificării conținutului de glucide în biomasa de spirulină produsă la cultivare în prezența compușilor seleniului este redată în figura 3.6. Selenitul de sodiu nu a modificat conținutul de glucide la concentrații de până la 30 mg/l. Pentru celelalte două concentrații ale compusului (40 și 50 mg/l), conținutul de glucide s-a majorat cu circa 8%. Pronina și colab. (2002) au stabilit, că odată cu creșterea concentrației în mediul de cultivare al spirulinei a acestui compus, se majorează și conținutul de glucide. Începând cu 500 mg/l și la concentrații mai mari are loc fenomenul de absorbție a selenitului pe glucidele secretate de celulele spirulinei și, ulterior, reducerea lui la valență zero și biomasa capătă o culoare roșietică [322]. Rezultate similare au fost descrise și de alți autori [115, 154].

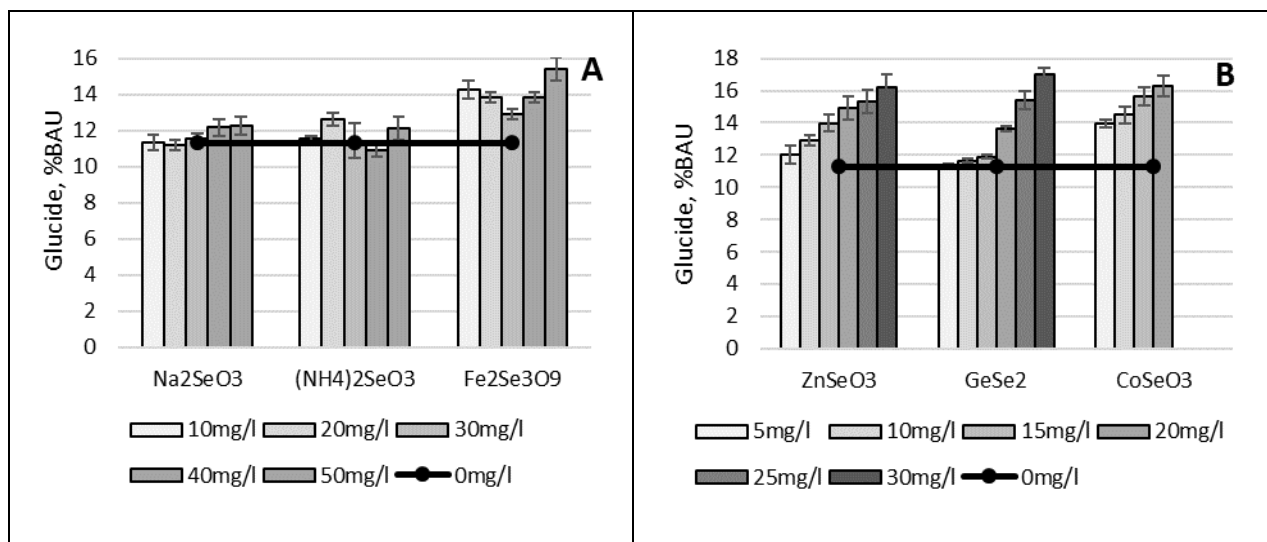


Fig. 3.6. Conținutul de glucide (% BAU) în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compuşilor: A - Na₂SeO₃, (NH₄)₂SeO₃, Fe₂Se₃O₉·6H₂O și B - ZnSeO₃, GeSe₂, CoSeO₃

Suplimentarea selenitului de amoniu, de asemenea, nu a modificat în mod semnificativ conținutul de glucide din biomasa de spirulină. Selenitul de fier hexahidrat a contribuit la sporirea sintezei glucidelor. Conținutul acestora crește cu 14 - 27,4% față de martor, în funcție de concentrația compusului din mediul de cultivare al spirulinei. Concentrația minimală, de 10 mg/l, a stimulat cu 26,4% sinteza de glucide de către spirulina.

În cazul compusului ZnSeO₃ s-a observat o dependență directă a conținutului de glucide în biomasa de spirulină de concentrația acestuia în mediul de cultivare: cu cât concentrația compusului este mai înaltă, cu atât crește conținutul de glucide în biomasă. La concentrația de 30 mg/l selenit de zinc, conținutul de glucide în biomasa de spirulină a crescut cu 40%.

Selenura de germaniu în concentrația de 20 mg/l a stimulat sinteza glucidelor cu 36,5%, iar la concentrația de 30 mg/l, nivelul acumulat în biomasă a lor, a fost cu 50% peste nivelul martorului. Concentrațiile de 5, 10, și 15 mg/l nu au modificat acumularea de glucide, conținutul cărora a rămas la nivelul martorului.

Toate concentrațiile de CoSeO₃ au sporit sinteza glucidelor în biomasa spirulinei. În comparație cu martorul, s-a observat o creștere cu 23,6 - 44,0% a conținutului de glucide. Conținutul maximal de glucide în biomasă, de 16,27% (cu 44,0% mai mult față de martor), a fost stabilit la concentrația selenitului de cobalt de 20 mg/l. Cel mai înalt nivel de acumulare a glucidelor s-a stabilit la adăugarea compusului testat în concentrația lui maximală.

Afirmația este valabilă pentru toți compuși seleniului studiați. Creșterea maximală a conținutului de glucide, cu 50,3%, comparativ cu martorul a fost stabilită la cultivarea spirulinei

pe mediul nutritiv suplimentat cu 30 mg/l GeSe_2 . Compușii Na_2SeO_3 și $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$ nu au modificat conținutul glucidelor în biomasa spirulinei.

Lipidele, sunt, de asemenea compuși biologic activi ai spirulinei cu funcții importante, în primul rând de structurare și fluidizare a membranelor. În condiții de stres indus, când cultura de spirulină dezvoltă mecanisme de adaptare la condițiile de cultivare, conținutul de lipide în biomasă crește. În biomasa de spirulină, conținutul de lipide poate fi majorat prin modificarea condițiilor de cultivare [43] sau prin intermediul stimulatoarelor [12].

A fost stabilit impactul compușilor seleniului și asupra dinamicii acumulării lipidelor în biomasa de spirulină (figura 3.7).

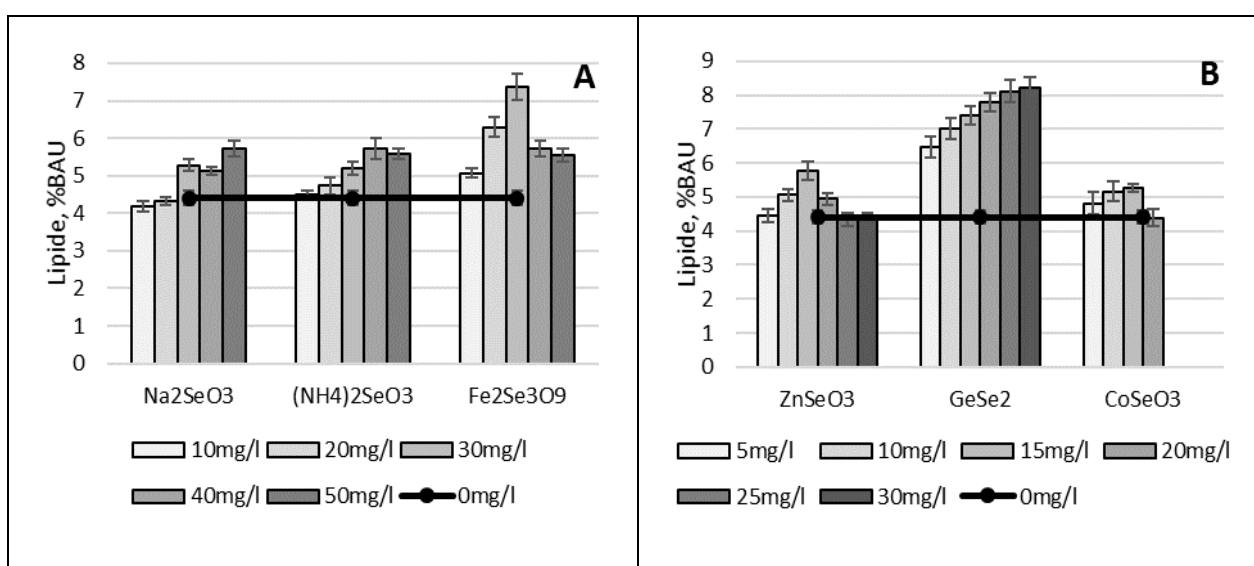


Fig. 3.7. Conținutul de lipide (% BAU) în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na_2SeO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3$, $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și B - ZnSeO_3 , GeSe_2 , CoSeO_3

Compusul Na_2SeO_3 în concentrațiile de la 30 până la 50 mg/l a indus creșterea conținutului de lipide în biomasa de spirulină. Pronina și colab. (2002) au stabilit, că Na_2SeO_3 în concentrațiile de 10 - 100 mg/l contribuie la o creștere de 2 ori a conținutului de lipide în biomasa de spirulină [207]. Huang și colab. (2006) relatează că adăugarea de selenit de sodiu în concentrație de 10 mg/l duce la o scădere cu 12% a conținutului total de lipide în biomasa de spirulină [114].

O astfel de discrepanță în date este rezultatul utilizării diferitor tulpini ale spirulinei, a condițiilor diferite de cultivare și a duratei de cultivare. În cazul nostru, acumularea maximală de lipide în biomasă se realizează la concentrația de 50 mg/l selenit de sodiu: conținutul de lipide

este de 5,72% (pe fonul conținutului de Se de 24,16 mg%), ceea ce este cu 29,7% mai mult față de martor.

Selenitul de amoniu, la fel, în concentrațiile de 30-50 mg/l, a stimulat sinteza lipidelor, conținutul lor în biomasă fiind de 4,49 - 5,95%. Conținutul maximal de lipide în biomasă - 5,95%, a fost stabilit la concentrația de 50 mg/l selenit de amoniu (pe fonul a 14,44 mg% seleniu acumulat).

O creștere similară a conținutului de lipide în biomasă, a fost determinată și pentru concentrația de 50 mg/l selenit de sodiu și de selenit de amoniu (pe fonul unui conținut al seleniului de 22,8 mg/l și de 24 mg/l, respectiv). Conținutul diferit de seleniu în cazul dat demonstrează, că acumularea lui în biomasa de spirulină nu determină modificarea activității de biosinteză a lipidelor de către spirulina.

Selenitul de zinc a stimulat sinteza lipidelor la concentrațiile de 10 mg/l și 15 mg/l. Conținutul de lipide în biomasă a constituit 5,07% și 5,77% (pe fonul conținutului de seleniu acumulat de 9 și 19 mg%, respectiv), ceea ce este cu 16% și cu 31%, respectiv peste nivelul martorului. Menținerea conținutului de lipide la nivelul fiziologic al culturii, care a fost determinat pentru concentrații mai înalte ale selenitului de zinc poate fi dovada acomodării culturii de spirulină la stresul indus de prezența compusului în mediul de cultivare.

În prezența compusului CoSeO_3 (5 - 15 mg/l), conținutul de lipide a crescut în biomasa de spirulină de la 4,82 la 5,26%, ceea ce este cu 9 - 19% peste nivelul martorului. Conținutul maximal de lipide de 5,26% a fost stabilit la o concentrație a seleniului introdusă prin compus în mediul de cultivare de 6,36 mg/l, iar cantitatea de seleniu acumulat a fost 19 mg%, ceea ce demonstrează, că acumularea seleniului nu are impact asupra sintezei lipidelor. O creștere a concentrației de CoSeO_3 peste 15 mg/l a condus la scăderea conținutului de lipide, dar până la nivelul fiziologic al culturii cianobacteriene.

Selenitul de fier hexahidrat a favorizat acumularea seleniului în biomasa spirulinei, conținutul acumulat al căruia este determinat de concentrația seleniului introdus în mediul de cultivare. Conținutul de lipide în biomasă este crescut pentru toate concentrațiile selenitului de fier hexahidrat aplicate. Conținutul maximal, de 7,38% lipide în biomasă, a fost determinat la concentrația de 30 mg/l compus, ceea ce este cu 67% peste nivelul martorului [75]. La concentrațiile compusului de 40 și de 50 mg/l, conținutul de lipide a scăzut, dar în același timp acesta a fost, totuși, mai mare cu 26 - 30%, comparativ cu martorul. Se poate presupune, că compusul este, astfel, implicat în sinteza lipidelor care este determinată de cantitatea lui introdusă în mediul nutritiv, dar care nu depinde de conținutul acumulat al seleniului în biomasă.

Compusul GeSe_2 , pentru care, de asemenea, au fost determinate niveluri înalte ale seleniului acumulat în biomasă, a indus sinteza lipidelor pentru toate concentrațiile testate. O acumulare semnificativă de lipide, cu 47% în comparație cu martorul, a fost stabilită pentru concentrația de 5 mg/l compus. Conținutul de lipide determinat în biomasa obținută la cultivarea spirulinei în prezența selenurii de germaniu este direct proporțional cu concentrația compusului. Cel mai înalt conținut de lipide în biomasa de spirulină, de 8,21% (cu 86% mai mult comparativ cu martorul), a fost stabilit la concentrația selenurii de 30 mg/l. Creșterea în continuare a conținutului de lipide în biomasa spirulinei odată cu creșterea concentrației selenurii în mediul de cultivare poate fi rezultatul unei sensibilizări a activității biosintetice a culturii.

Prin urmare, toți compușii testați ai Se (IV), într-un mod sau altul, contribuie la creșterea conținutului de lipide, care nu depinde de valoarea seleniului acumulat în biomasa de spirulină. Conținutul înalt de lipide în biomasă poate fi datorat unui posibil stres indus de compușii seleniului. Pentru a confirma sau infirma acest fapt, a fost necesară determinarea produselor degradării oxidative a lipidelor ca rezultat a acumulării în exces a radicalilor liberi.

3.1.2.1 Evaluarea conținutului produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor anorganici ai Se (IV)

Sunt importante nu numai rezultatele impactului compușilor seleniului asupra productivității spirulinei și compoziției sale biochimice. O acumulare în exces a produselor degradării oxidative a lipidelor poate reduce semnificativ din valoarea biologică a biomasei de spirulină, și prin urmare și din siguranța ei în calitate de materie primă pentru producerea de diverse preparate. Testul dialdehidei malonice (testul DAM) este utilizat în aprecierea nivelului de stres oxidativ indus în cultura de spirulină ca rezultat a modificării condițiilor de cultivare [13, 54]. În cercetarea de față testul DAM a fost aplicat în calitate de marker al unei posibile toxicități a compușilor seleniului (seleniului acumulat) pentru cultura de spirulină. În figura 3.8. este redat grafic conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivarea ei în prezența compușilor anorganici ai seleniului (seleniului acumulat). Un conținut al dialdehidei malonice la nivelul martorului a fost determinat pentru toate concentrațiile seleniului de sodiu și seleniului de amoniu. Acumularea din acești compuși a unor cantități de seleniu de 14,44 și de 24,16 mg% în biomasa de spirulină nu este un proces însoțit de acumularea în exces a radicalilor liberi și oxidarea lipidelor. Deci, prezența în mediul de cultivare a seleniului, dar nici a sodiului și nici a amoniului, nu prezintă pericol pentru cultura de spirulină.

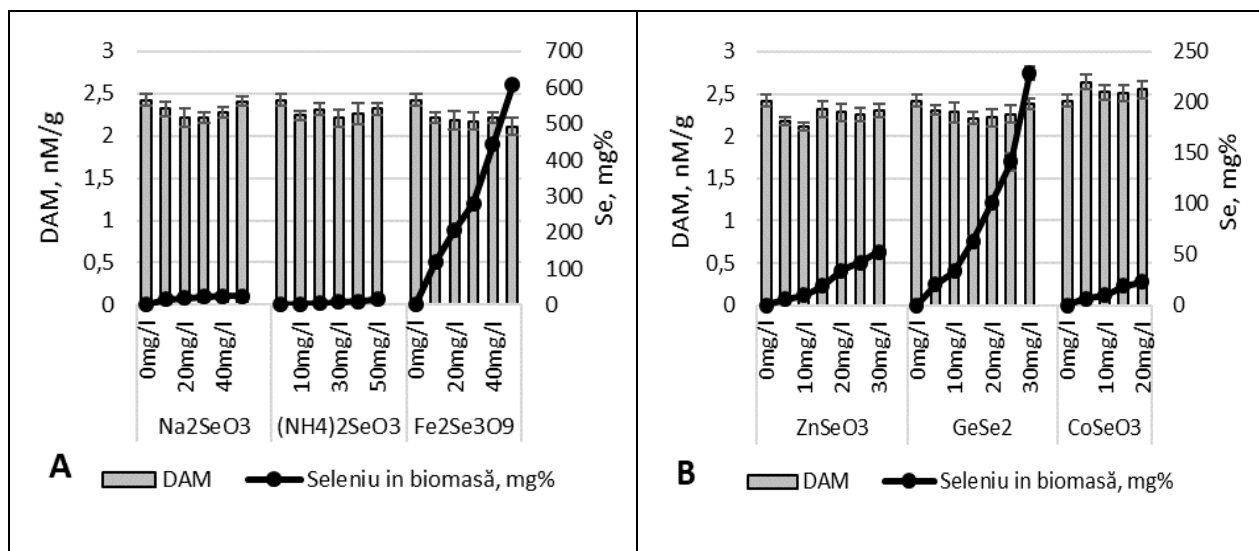


Fig. 3.8. Cantitatea de dialdehidă malonică (DAM, nM/g) în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor: A - Na₂SeO₃, (NH₄)₂SeO₃, Fe₂Se₃O₉·6H₂O și B - ZnSeO₃, GeSe₂, CoSeO₃

Conținutul DAM s-a majorat în limitele a 3,6 - 9,1% comparativ cu martorul în biomasa obținută în prezența selenitului de cobalt, în limita concentrațiilor aplicate ale acestui compus. În cazul selenitului de zinc nivelul dialdehidei malonice s-a diminuat nesemnificativ (de la 4,1 până la 12,8%). Modificarea conținutului de DAM la adăugarea compușilor ZnSeO₃ și CoSeO₃ nu este determinată de concentrația suplimentată și nu depinde de cantitatea de seleniu acumulat: seleniul acumulat constituie 52,64 mg% în cazul selenitului de zinc și 22,71 mg% în cazul selenitului de cobalt.

La suplimentarea Fe₂Se₃O₉·6H₂O și GeSe₂, în prezența cărora în biomasa de spirulină se acumulează (comparativ cu ceilalți compuși) cea mai mare cantitate de seleniu, nivelul dialdehidei malonice, la fel, nu s-a modificat esențial comparativ cu martorul.

Astfel, datele testului DAM demonstrează lipsa unei creșteri semnificative a nivelului dialdehidei malonice, chiar și în variantele cu cantitățile cele mai înalte de seleniu acumulat - în cazul selenitului de fier hexahidrat și a selenurii de germaniu. Se poate afirma deci, despre lipsa reacției oxidative necontrolate în cultura spirulinei, care rezistă la stres și răspunde prin sinteza constantă a lipidelor care mențin fluiditatea membranelor și viabilitatea celulară. Dovada acestei afirmații este și conținutul înalt de biomasă produsă sau la nivelul martor a culturii. Prin urmare, compușii testați ai seleniului nu sunt toxici pentru cianobacteria *Arthrospira platensis* în limita concentrațiilor aplicate, în timp ce procesele vitale nu sunt întrerupte și echilibrul compoziției sale biochimice nu este perturbat.

3.1.2.2 Modificarea activității antioxidante în procesul de acumulare a seleniului în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11

Testul dialdehidei malonice nu este singurul indicator al stresului instalat în cultura de spirulină. În ultimii ani, un mare interes au antioxidanții naturali din produsele alimentare, suplimente, medicamente ș. a. [37, 159, 273].

Spirulina conține carotenoizi, acid ascorbic, vitamine (B1, B2, B6, B12, E, K), polizaharide, acizi grași polienici, acizi organici, aminoacizi, fenoli și alte substanțe biologice active, care determină statutul antioxidant al biomasei [171 - 172]. În condiții de stres puternic activitatea antioxidantă a spirulinei crește sau se reduce în dependență de raportul dintre sinteza și consumul substanțelor cu efect antioxidant. Acest indicator se poate modifica în dependență de condițiile de cultivare și statutul oxidativ a culturii de spirulină, și la fel, poate fi considerat un marker al stresului instalat [2, 295].

A fost urmărită dinamica valorilor testului antioxidant ABTS a extractelor hidrice (în calitate de indicator monitorizat) obținute din biomasa de spirulină (figura 3.9). A fost stabilită o reducere a activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasa obținută la cultivarea spirulinei în prezența selenitului de amoniu: valorile testului antioxidant au fost cu 20,58 - 35,9% mai diminuate decât martorul. După cum a fost stabilit anterior, acumularea seleniului din acest compus este lentă și cu un nivel, respectiv mic al lui în biomasă: conținutul seleniului în biomasă crește doar de la 2,15 mg% la 14,44 mg%.

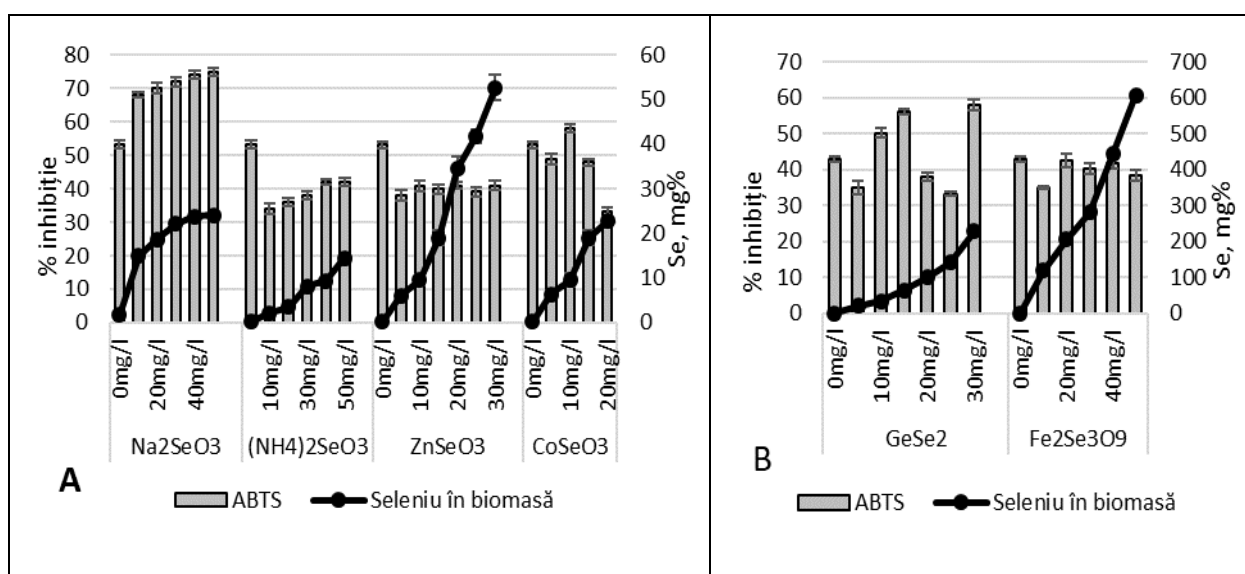


Fig. 3.9. Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice (% inhibiție ABTS) din biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 și nivelul seleniului acumulat (mg%) la cultivare în prezența compușilor: A - Na₂SeO₃, (NH₄)₂SeO₃, ZnSeO₃, CoSeO₃ și B - GeSe₂, Fe₂Se₃O₉·6H₂O

La cultivarea spirulinei în prezența selenitului de sodiu activitatea antioxidantă a extractelor hidrice a crescut, însă, cu 28,3% la concentrația de 100 mg/l și cu 41,6%, respectiv, la concentrația de 50 mg/l compus, comparativ cu martorul.

Ca și în cazul compusului precedent, acumularea seleniului din selenitul de sodiu a decurs lent, în biomasa de spirulină acumulându-se o cantitate relativ mică de microelement. Creșterea activității antioxidante a extractelor hidrice denotă prezența efectului oxidativ al selenitului de sodiu, ca rezultat al proceselor intensive biosintetice în cultura de spirulină care se manifestă pornind de la concentrațiile mici ale compusului în mediul de cultivare.

Pentru selenitul de cobalt au fost stabilite trei concentrații: 5 mg/l, 10 mg/l și 15 mg/l care nu au modificat activitatea antioxidantă a extractelor hidrice, valorile testului antioxidant oscilând cu variații neesențiale în limitele valorice ale activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasa spirulinei cultivată în condiții standard (cu 7,55% sub limitele martorului și cu 9,61% mai mare ca acesta). Concentrația selenitului de cobalt de 20,0 mg/l care a asigurat o acumulare de circa 23 mg% seleniu în biomasă a redus cu circa 38% activitatea antioxidantă a extractului hidric. Astfel, se poate considera că dozele de 5 - 15 mg/l selenit de cobalt nu au indus stresul oxidativ în cultura de spirulină, spre deosebire de concentrația compusului de 20 mg/l.

În prezența selenitului de zinc nivelul de acumulare a seleniului în biomasă a crescut odată cu majorarea concentrației compusului în mediul de cultivare, iar pe fonul acestei dinamici, indicele respectiv s-a redus cu circa 8 - 24%. La concentrația de 30 mg/l la care se determină conținutul cel mai mare, de 52 mg% seleniu în biomasă, activitatea antioxidantă a rămas la valori reduse de circa 41% inhibiție radical ABTS, ceea ce este cu 22,6% mai jos de nivelul martorului. Astfel, efectul toxic oxidativ al selenitului de zinc se manifestă pentru toate concentrațiile testate ale compusului, dovadă fiind consumul intens al componentelor antioxidante.

Comparativ cu compușii analizați anterior, în prezența a 5 mg/l selenură de germaniu activitatea antioxidantă a extractului hidric s-a redus cu circa 18%, iar la concentrația de 10 mg/l, capacitatea antioxidantă a crescut, deja, cu circa 16% comparativ cu martorul. La fel și în cazul concentrației de 15 mg/l compus - activitatea antioxidantă a crescut față de concentrația precedentă a selenurii de germaniu cu circa 14%. La concentrația selenurii de 25 mg/l, activitatea antioxidantă, iarăși s-a redus cu circa 20%. Aceasta a crescut din nou, cu circa 35% comparativ cu martorul, la concentrația de 30 mg/l, concentrație care a determinat cel mai înalt conținut al seleniului în biomasă - circa 220 mg%.

Activitatea antioxidantă (în baza extractelor hidrice) a spirulinei cultivată în prezența selenitului de fier hexahidrat (pentru care de altfel a fost caracteristică o acumulare mai intensă a seleniului în biomasă), și-a menținut nivelurile în limitele matorului. Excepție, concentrația de 10 mg/l (circa 118 mg% seleniu acumulat) și cea maximală de 50 mg/l (circa 600 mg% acumulat). La aceste concentrații de compus/conținut de seleniu, activitatea antioxidantă a fost cu circa 18% (10 mg/l), și cu circa 12% (50 mg/l) mai redusă. Se poate presupune deci, despre implicarea compusului în activitatea biosintetică a spirulinei și lipsa efectului lui toxic oxidativ indus asupra culturii.

Astfel, datele testului antioxidant cu utilizarea radicalului ABTS (după extractele hidrice) demonstrează, că efectul compușilor seleniului testați asupra tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 poate fi caracterizat ca netoxic sau toxic moderat. Modificarea activității antioxidante nu depinde de concentrația /cantitatea seleniului în mediul de cultivare și respectiv, nici de conținutul seleniului în biomasă [4].

3.2 Procedee de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu bioorganic

Rezultatele obținute la etapele anterioare ale cercetării au scos în evidență faptul, că seleniul prezintă o rată de acumulare diferită în biomasa de spirulină (în raport cu concentrațiile compușilor/cantitatea de seleniu introdusă prin compus), iar concentrațiile testate nu afectează producerea de biomasă care se păstrează la un nivel relativ bun. Compușii care au asigurat niveluri mult mai înalte de acumulare a seleniului, fără a deteriora sever procesele de producere a biomasei și cele biosintetice la spirulina, și respectiv compoziția ei sunt selenitul de fier hexahidrat și selenura de germaniu. Spirulina cultivată în prezența selenitului de fier hexahidrat (50 mg/l) acumulează circa 600 mg% seleniu în biomasă. În prezența selenurii (30,0 mg/l), conținutul de seleniu în biomasă este de circa 228 mg%.

Procesul de acumulare a seleniului este dependent de un șir de factori, printre care este gradul diferit de disociere al compușilor seleniului. Se știe, că rata de acumulare a seleniului mai depinde și de includerea mai rapidă a sulfului, cu care concurează seleniul în metabolismul aminoacizilor ce conțin sulf: metionina și cisteina. Acumularea seleniului în biomasă depinde direct și de cantitatea de seleniu introdusă în mediul nutritiv.

În componența mediului de cultivare pentru tulpina de spirulină utilizată în lucrarea de față sunt prezente două săruri care conțin sulf: sulfatul de potasiu și sulfatul de magneziu. S-a demonstrat, că sulfatul de magneziu se impune ca factor cu influență negativă asupra procesului

de acumulare a seleniului. De aceea, această sare a fost înlocuită în mediul de cultivare al spirulinei preparat în scopul acumulării seleniului, cu clorura de magneziu, iar concentrația sulfatului de potasiu a fost micșorată de 2 ori. Totodată, procesul de includere a seleniului în biomasa de spirulină este mai eficient la un pH = 8,0 - 8,5. Pentru menținerea pH-ului la valorile menționate, cultura de spirulină pe perioada cultivării se barbotează cu CO₂ [12].

În continuarea cercetării au fost montate experiențe în care tulpina de spirulină din acest studiu a fost cultivată în *condiții specifice* de acumulare a seleniului: *pe mediul nutritiv cu conținut redus de sulfați (1) și la un pH 8,0-8,5(2). Suplimentarea în rate a compușilor selectați (3) și la diferite intervale de creștere a culturii (4)* au servit drept parametri cu care s-a manipulat în cadrul acestei serii experimentale, pentru a atinge *cote mai mari de acumulare a seleniului în biomasa de spirulină*. Rezultatele obținute sunt aduse în tab. 3.3 și 3.4. Vom menționa faptul, că în cazul acestor experiențe creșterea cantității de seleniu a fost monitorizată în raport cu nivelul de producere al biomasei, selectat de noi în calitate de indicator de control al procesului.

Tabelul 3.3. Nivelul de biomasă produsă și cantitatea de seleniu acumulat în prezența selenitului de fier hexahidrat (50 mg/l) suplimentat în rate și la diferite perioade de cultivare a *A. platensis*

Perioada ciclului de cultivare la care a fost suplimentat compusul	Biomasa, %M	Conținutul de seleniu în biomasă, mg%
1 zi de cultivare	113,92	606,9±7,49
3-a zi de cultivare	109,31	656,8±9,60
½ (1-a zi de cultivare) și ½ (3-a zi de cultivare)	115,31	694,2±4,12
Martor	100,00 (1,053±0,010)	0,161±0,05

Rezultatele experimentale obținute în cazul selenitului de fier hexahidrat, au scos în evidență, că suplimentarea compusului în rate: ½ (în concentrație 25 mg/l) în 1-a zi și ½ (în concentrație 25 mg/l) în a 3-a zi de cultivare a condus la concentrarea efectului exercitat de către acesta, atât asupra procesului de acumulare a seleniului, cât și asupra procesului de creștere al spirulinei, nivelul de producere al biomasei crescând chiar, cu circa 15% (în raport cu spirulina crescută în condiții standard). Conținutul seleniului în biomasa de spirulină cultivată în prezența selenitului de fier hexahidrat administrat în condițiile date ale experienței a atins cota de 694,2 mg% (tabelul 3.3). În cazul selenurii, acumularea maximală a seleniului în biomasă – 378,50 mg% fără a modifica principal producerea de biomasă (în jurul a 94% în raport cu martorul), a fost atinsă la suplimentarea acestuia (în concentrație de 30mg/l la cultura de spirulină, în a 3-a zi de cultivare (tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Nivelul de biomasă produsă și cantitatea de seleniu acumulat la cultivarea *A. platensis* în prezența selenurii de germaniu (30 mg/l) suplimentată în rate și la diferite perioade de cultivare

Perioada ciclului de cultivare la care a fost suplimentat compusul	Biomasa, %M	Conținutul de seleniu în biomasă, mg%
1 zi de cultivare	99,71	228,27±6,67
3-a zi de cultivare	94,60	378,50±2,70
½ (1-a zi de cultivare) și ½ (3-a zi de cultivare)	99,99	243,77±6,33
Martor	100,00 (1,053±0,010)	0,161±0,05

Studii orientate spre elucidarea mecanismelor de bioacumulare a metalelor în biomasa cianobacteriană și microalgă indică implicarea în procesul de acumulare a membranei și peretelui celular, precum și formarea legăturilor între metal și liganzii citoplasmatici, fitochelatinele și metaloproteinele și altor molecule intracelulare. Grupurile funcționale implicate, așa ca – OH (hidroxil); - PO₃O₂ (fosforic); - NH₂ (aminic); - COOH (carboxilic); -SH (sulfhidric) sunt repartizate în diferite clase de substanțe organice, astfel ca proteinele, glicolipidele, peptidoglicanii, polizaharidele și au fiecare în parte o constantă specifică de disociere. *Arthrospira platensis* (spirulina) conține componente donatoare de grupuri funcționale active prin care acestea sunt implicate în procesele de bioacumulare și biotransformare a fometelor anorganice în cele organice a metalelor. Conform datelor unor autori, formele de seleniu acumulat în biomasa de spirulină sunt: seleniul organic (de până la 80 - 85% din seleniul acumulat) și formele anorganice - seleniul (IV) (de până la circa 13%) și seleniul VI (circa 1%), demonstrând că în procesul de creștere al spirulinei cea mai mare parte a seleniului anorganic se transformă eficient în cel organic [42].

În continuare, s-a determinat în care din fracțiile biologic active ale biomasei de spirulină s-a repartizat seleniul. În acest scop, biomasa de spirulină obținută prin cultivare în prezența compușilor seleniului care asigură acumularea optimală a lui în condițiile specifice de proces, a fost supusă fracționării. Astfel, au fost obținute fracțiile de compuși cu masa moleculară mică și medie - aminoacizi liberi și oligopeptide, proteine, glucide și lipide. Rezultatele care reflectă distribuția seleniului în aceste fracții ale biomasei de spirulină sunt redată de figura 3.10: **A** - biomasa obținută în prezența selenitului de fier hexahidrat, **B** - biomasa obținută în prezența selenurii de germaniu.

Din conținutul total de seleniu acumulat în biomasa de spirulină, în fracțiile biologic active obținute din biomasa crescută în prezența selenitului de fier hexahidrat au fost determinate

74,8%. În fracțiile biologic active din biomasa obținută în prezența selenurii de germaniu s-au determinat sumar 71,7% din conținutul total de seleniu.

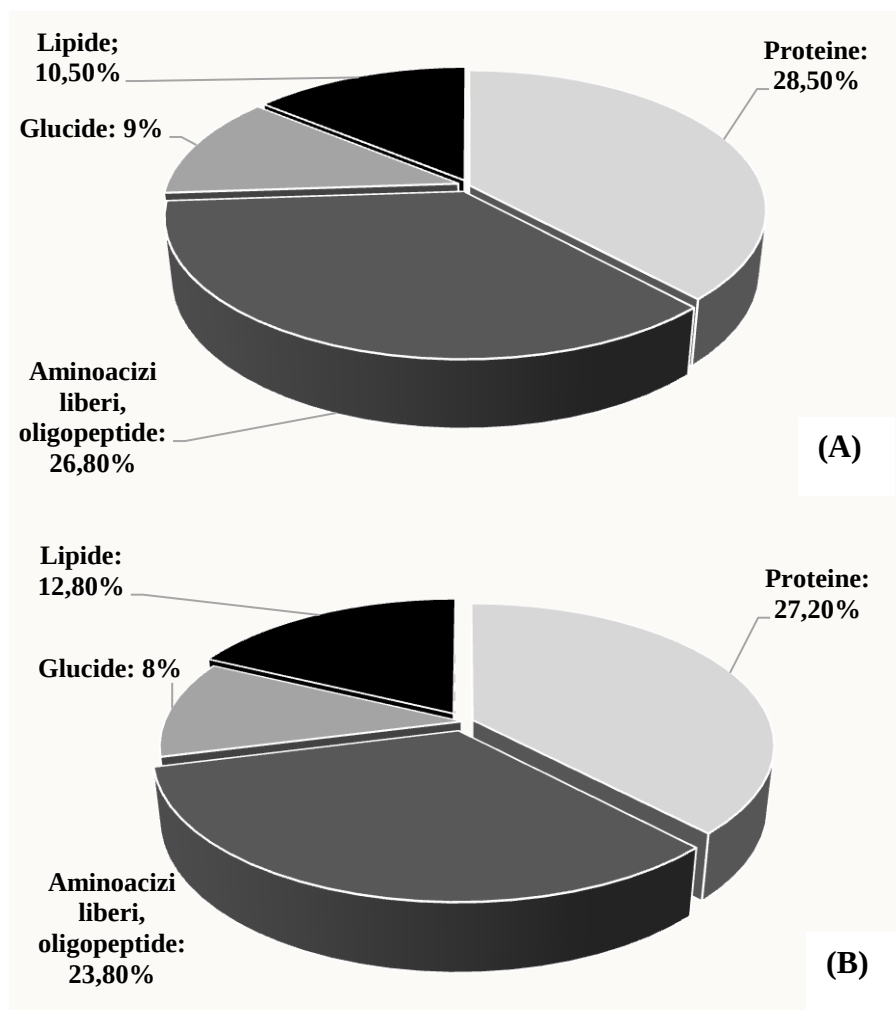


Fig. 3.10. Distribuția seleniului în diferite fracții biologic active ale biomasei de spirulină obținută: (A) - în prezența selenitului de fier hexahidrat și (B) - în prezența selenurii de germaniu

Dintre toate fracțiile biomasei obținute, proteinele au demonstrat cea mai înaltă capacitate de a lega seleniul - 28,5% total (selenitul de fier hexahidrat) și 27,2% total (selenura de germaniu). În fracția biologic activă care conține aminoacizi liberi și oligopeptide, de asemenea, distribuția seleniului a fost la o cotă înaltă - 26,8 % total în cazul selenitului de fier hexahidrat și respectiv 23,8% total în cazul selenurii de germaniu. În fracția lipidelor s-au determinat 10,5% total (selenitul de fier hexahidrat) și 12,8% total (selenura de germaniu), iar în fracția glucidelor – 9,0% total (selenitul de fier hexahidrat) și 8,0% total (selenura de germaniu).

Rezultatele cercetărilor noastre demonstrează, că la aplicarea ambilor compuși ai seleniului, majoritatea seleniului anorganic se biotransformă în organic prin integrarea în compușii cu masa moleculară mică și medie (circa 23 - 26%) și proteinele (circa 27 - 28%). Se știe, că seleniul se poate include în metabolismul aminoacizilor și proteinelor ce conțin sulf prin substituirea sulfului din aceștia, fapt demonstrat prin prezența seleno-analogilor pe parcursul acumulării seleniului în biomasă [271]. Glucidele (circa 8 - 9% seleniu organic), de asemenea, sunt implicate în acumularea seleniului. În cazul glucidelor, seleniul este încorporat în peptidoglicanii peretelui celular. În fracția lipidică au fost determinate circa 10 - 12% seleniu [57]. În ceea ce privește lipidele, unii autori sugerează, că seleniul în aceste componente biologice active nu este încorporat metabolic, ci legat noncovalent de acestea [94, 207].

Astfel, cultivarea tulpinii *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) în condițiile stabilite asigură obținerea unei biomase cu un conținut sporit al seleniului organic care se conține la niveluri înalte (circa 59 - 64% total) în fracțiile biologice active ale acesteia, inclusiv determinat în lipide (10 - 13%).

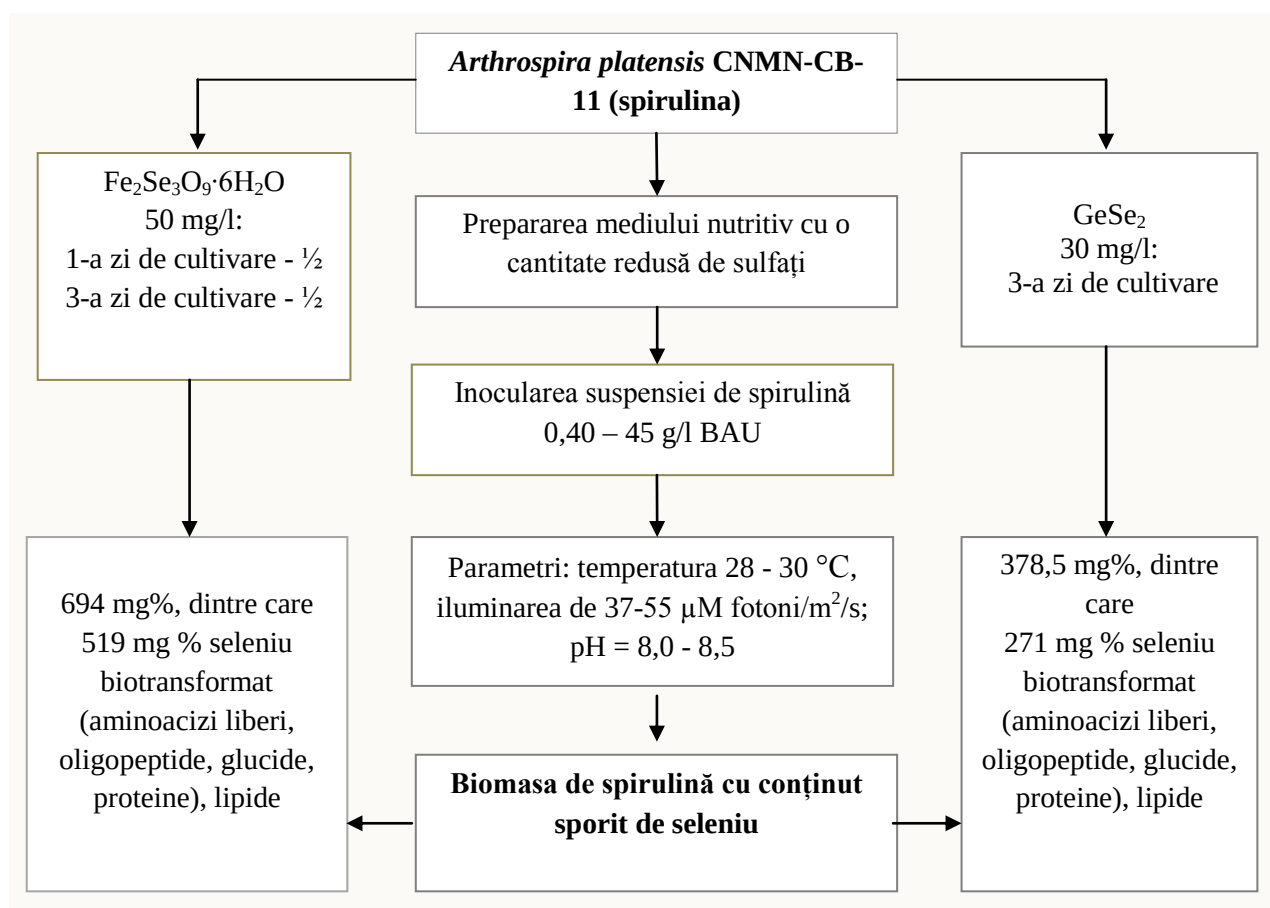


Fig. 3.11. Schema generalizată de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu [6, 58]

În figura 3.11 este redată schema generală de realizare a celor 2 procedee de obținere a biomasei cu un conținut sporit de seleniu în procesul de cultivare a tulpinii cianobacteriei *A. platensis* CNMN-CB-11, care se realizează conform următoarei succesiuni de proceduri:

La prima etapă de realizare a procedeeelor se prepară mediul nutritiv cu următoarea compoziție: (în g/l) NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -2,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -0,5; Na_2HPO_4 -0,2; MgCl_2 -0,05; CaCl_2 -0,024; 1 ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015; FeEDTA -1 ml/l mediu. Fiecare sare în cantitatea și succesiunea indicată se cântărește și se dizolvă în volumul de apă potabilă echivalent cu 3/5 din volumul unui vas cu capacitatea de 10 l. Se adaugă soluțiile de microelemente și fier helatat. Se aduce volumul mediului nutritiv la cota de 10 l.

La etapa a doua, în volumul de mediu nutritiv preparat, se inoculează tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina), cantitatea de cultură care trebuie introdusă este de 0,4 - 0,45 g/l în recalcul la biomasa absolut uscată de spirulină. Cultura de spirulină se transferă a câte 500 ml în retorte conice din sticlă cu volumul total de 1000 ml. Introducerea compușilor seleniului se efectuează conform procedurii:

- (1) *Procedeul cu aplicarea selenitului de fier hexahidrat $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ în concentrație de 50mg/l:* Se prepară soluția standard cu concentrația de 10 mg/ml în volumul recalculat la concentrația de 50 mg/l. Jumătate din soluția de selenit de fier hexahidrat se adaugă la cultura de spirulină în primele ore de la începutul *procesului de creștere* (1-a zi de cultivare) și cealaltă jumătate la începutul celei de a 3-a zi de cultivare.
- (2) *Procedeul cu aplicarea selenurii de germaniu GeSe_2 în concentrație de 30 mg/l:* Se prepară soluția de compus cu concentrația de 10 mg/ml. Volumul de soluție obținută recalculat la concentrația de 30 mg/l selenură se adaugă la cultura de spirulină la începutul celei de a 3-a zi de cultivare.

Etapă de cultivare a tulpinii *A. platensis* CNMN-CB-11. Procesul de cultivare al spirulinei durează 144 ore și se realizează cu respectarea parametrilor: în primele 48 ore, temperatura de 28 °C; pH-ul mediului 8,0 - 8,5, și în următoarele 96 ore: temperatura de 30 °C; pH-ul 8,0 - 8,5; intensitatea iluminării până la 37 - 55 μM fotoni/ m^2/s . În scopul menținerii pH-ului la valoarea 8,0 - 8,5, cultura de spirulină pe durata cultivării se supune barbotării cu CO_2 .

La etapa finală (sfârșitul ciclului de cultivare), cultura de spirulină crescută în prezența concentrațiilor selectate ale compușilor seleniului se supune filtrării printr-un filtru din hârtie demineralizată și umectat în prealabil cu apă purificată. După, în vederea înlăturării surplusului de săruri de pe suprafața celulelor, biomasa se spală cu o soluție de acetat de amoniu de 1,5%, se supune uscării și se determină conținutul de seleniu.

3.3. Tehnologia integrată de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu în baza biomasei de spirulină

Unul dintre avantajele importante ale cianobacteriilor și microalgelor în calitate de obiecte biotehnologice, este posibilitatea de a integra eficient în cadrul unui și aceluiași flux neîntrerupt de fabricare mai multe procese, începând cu cele de producere a biomasei cu un nivel sporit de componente biologice active prin sinteză dirijată și în condiții optime prestabilite de proces, după care fluxul tehnologic poate continua cu procesarea fracționată a biomasei în vederea obținerii, unul după altul, a unor componente biologice active aparte. În final, biomasa cianobacteriană sau microalgă poate servi, pe de o parte, ea însăși în calitate de produs finit cu o formulă stabilă, sau poate servi în calitate de materie primă biologic activă, din care să fie obținute un șir de preparate policomponente cu diverse proprietăți benefice. Toate acestea au fost demonstrate pentru tulpina *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) utilizată în prezenta cercetare, o tulpină care s-a confirmat în producerea în serie, fiind valorificată la nivel industrial pentru obținerea suplimentelor alimentare și produselor farmaceutice sub denumirea comercială „BioR” la „FICOTEHFARM” SRL (or. Chișinău, R. Moldova).

Utilizarea biomasei de spirulină în calitate de adaos alimentar este bine cunoscută. Cantitatea de biomasă care de obicei se utilizează în calitate de supliment este relativ mică, iar efectele manifestate sunt semnificative. Eficacitatea biologică înaltă a biomasei de spirulină este datorată prezenței complexelor de substanțe esențiale și caracteristice acesteia. Spirulina poate fi păstrată în stare naturală, iar organismul uman și cel animal posedă o digestibilitate ridicată a biomasei de spirulină. Compușii, sau fracțiile complexe extrase din biomasa de spirulină, de asemenea, pot fi componente ale diverselor preparate.

Pornind de la faptul, că acești compuși (și/sau fracțiile bioactive) sunt implicați în transformarea seleniului anorganic în organic, există oportunitatea obținerii în cadrul unui singur circuit tehnologic a unor produse selenorganice (suplimente și preparate) cu o funcționalitate și biodisponibilitate înaltă.

În primul rând, biomasa cu conținut sporit de seleniu, obținută conform celor două procedee de cultivare a spirulinei în prezența selenitului de fier hexahidrat și selenurii de germaniu poate, astfel, ea însăși servi datorită compoziției, drept *supliment (adaos) alimentar selenorganic* (tabelul 3.5) [16].

Tabelul 3.5. Compoziția biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu

Componentele biomasei, care participă la biotransformarea seleniului (exceptând lipidele)	Biomasa cu conținut sporit de seleniu obținută prin:		Biomasa de spirulină (Martor)
	Procedeul I (selenit de fier hexahidrat 50 mg/l: ½ - 1-a zi de cultivare, ½ - 3-a zi de cultivare)	Procedeul II selenura de germaniu 30 mg/l: 3-a zi de cultivare)	
	„ <i>Spirulina selenorganică - 1</i> ”	„ <i>Spirulina selenorganică - 2</i> ”	
Aminoacizi liberi	3,70%	3,20%	2,0%
Oligopeptide	8,40%	7,80%	8,90%
Proteine	52,15%	50,20%	65,20%
C-Ficocianina	4,80%	3,98%	8,50%
Glucide	12,90%	11,45%	13,95%
Lipide	8,85%	6,50%	5,50%
Seleniu	0,69%	0,378%	0,00015%

În biomasa îmbogățită cu seleniu (conform ambelor variante de obținere – cu utilizarea selenitului de fier hexahidrat sau cu aplicarea selenurii de germaniu) se conțin 3,2 - 3,7% aminoacizi liberi, 7,80 - 8,40% oligopeptide, 50,20 - 52,15% proteine, 3,98 - 4,80% C-ficocianină. Biomasa mai conține 11,45 - 12,90% glucide și 6,50 - 8,85% lipide.

Astfel, compoziția biomasei cu conținut sporit de seleniu nu prezintă abateri majore de la compoziția biomasei de spirulină, obținută în condiții fără adăugare de compuși ai seleniului. Același lucru se poate afirma și despre activitatea antioxidantă, determinată în extractele hidro-alcoolice de 50% obținute din această biomasă (tabelul 3.6).

În baza biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu au fost propuse 2 formule de compoziții ale unor produse ce pot fi utilizate în calitate de suplimente (adaosuri alimentare) ce conțin seleniul ca parte componentă efectivă: „*Spirulina selenorganică - 1*” și „*Spirulina selenorganică - 2*”

Tabelul 3.6. Activitatea antioxidantă (extract hidro-alcoolic de 50%, standardizat la concentrația de 1mg substanță uscată/ml) a biomasei de spirulină selenorganice

Biomasa cu conținut sporit de seleniu supusă testării:	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS
Biomasa de spirulina	62,0
Procedeul I (selenit de fier hexahidrat 50 mg/l : ½ - 1-a zi de cultivare, ½ - 3-a zi de cultivare) / „ <i>Spirulina selenorganică - 1</i> ”	82,0
Procedeul II selenură de germaniu 30 mg/l : 3-a zi de cultivare) / „ <i>Spirulina selenorganică - 2</i> ”	72,0

În al doilea rând, din biomasa de spirulină cu conținut sporit de seleniu, prin procesarea acesteia au fost extrase succesiv și obținute extracte de compuși biologic activi ai spirulinei care au asigurat un conținut maximal de seleniu biotransformat – aminoacizii liberi, oligopeptidele, proteinele.

În baza extractelor ce conțin aceste componente biologic active ale spirulinei au fost propuse 2 formule de compoziții de preparate ce conțin seleniu organic ca parte componentă efectivă: „*BioR-Selenium 1 și 2*” și „*Supliment Se-proteic 1 și 2*”. Prima formulă reprezintă un complex biologic activ care conține atât aminoacizii în stare liberă și în componența oligopeptidelor (compuși cu masa moleculară mică și medie). Cea de a doua compoziție reprezintă un extract proteic selenorganic.

Spectrul aminoacid al ambelor compoziții este redat, atât de aminoacizii neesențiali (glicina, alanina, serina, cisteina, tirozina, acidul aspartic, acidul glutamic, prolina), cât și cei esențiali (arginina, fenilalanina, histidina, izoleucina, leucina, lizina, metionina, treonina, triptofanul, valina), aceștia din urmă ne fiind sintetizați de organismul uman, solicitând astfel surse a lor din exterior. Din toată cantitatea aminoacidă, cea mai mare pondere în preparat o are acidul glutamic (cel puțin 50% din cantitatea totală de aminoacizi liberi și cel puțin 30% din cei legați).

Din complexul de aminoacizi, 10 aminoacizi sunt cunoscuți ca imunoactivi (cel puțin 55% din cantitatea totală de aminoacizi liberi și cel puțin 60% din cei legați): aminoacizii esențiali - valina, triptofanul, treonina, iar dintre cei non esențiali: acidul aspartic, acidul glutamic, alanina, arginina, cisteina, glicina, serina - acidul gama aminobutiric. Totodată, acidul glutamic, arginina, acidul aspartic, alanina, cisteina, fenilalanina, histidina, lizina, metionina, prolina, serina, triptofanul și tirozina din compoziția preparatelor posedă activitate antioxidantă specifică [21, 249, 252, 263].

Toate produsele formulate în baza/și din biomasa de spirulină cu conținut sporit de seleniu, au fost integrate într-un singur flux tehnologic de fabricare care este redat în figura 3.12, iar etapele succesive ale acestui flux sunt descrise în continuare.

I: Obținerea biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu și o compoziție biochimică echilibrată

La această etapă complexă, se realizează procesul de producere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu. Tulpina industrială a cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 se cultivă (conform unui sau altui procedeu descris în p. 3.4 al acestui compartiment) în condiții dirijate și controlate: surse de seleniu în concentrații și condiții prestabilite de

suplimentare la cultura de spirulină, condiții și parametri specifici procesului de acumulare a seleniului fără a afecta sever calitatea biomasei.

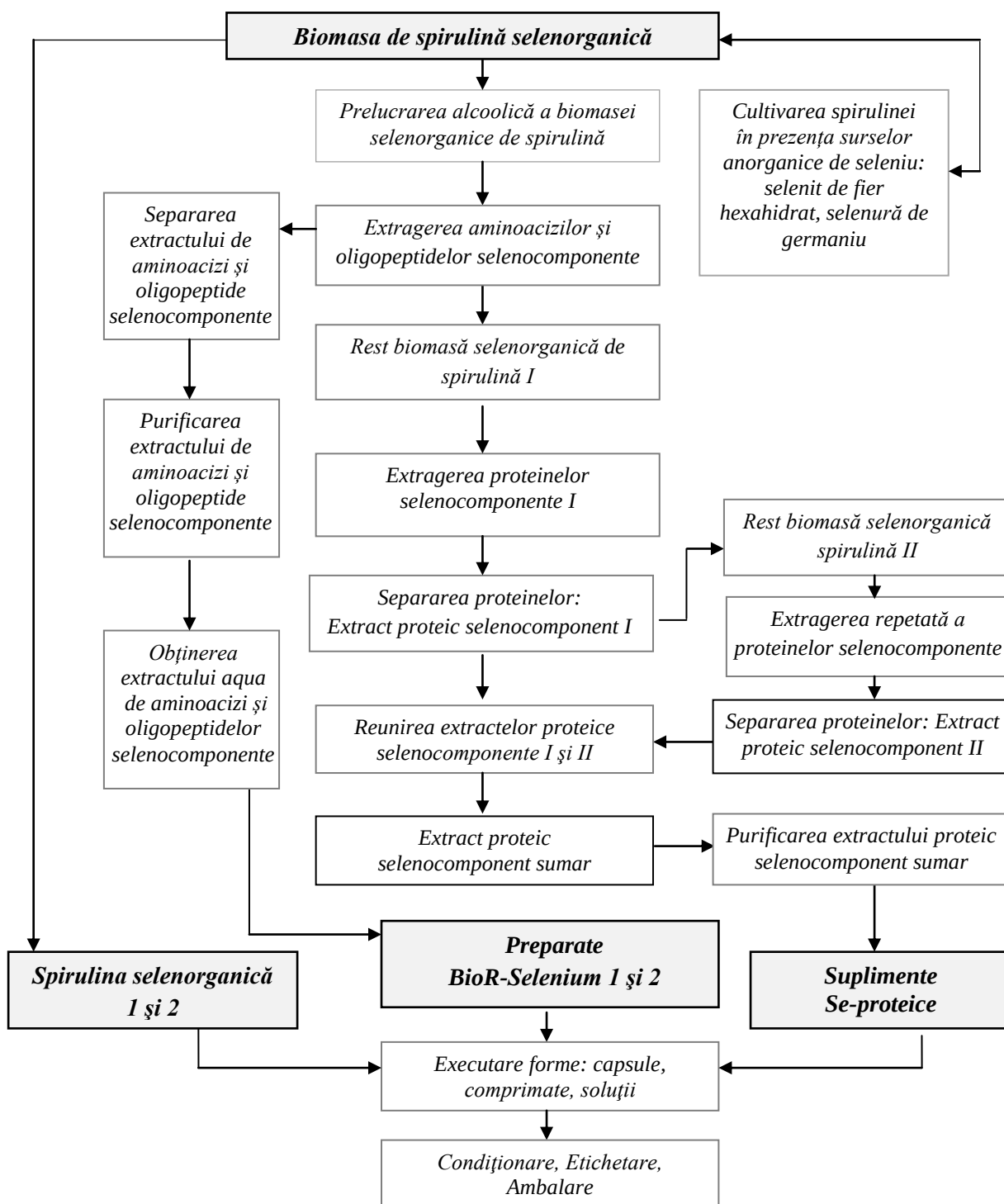


Fig. 3.12. Schema generalizată de obținere în cadrul unui circuit tehnologic a produselor (preparatelor și suplimentelor) ce conțin seleniul ca parte componentă efectivă

Rezultatul final al acestei etape sunt:

- A) *Produsele finite formulate în baza biomasei obținute: „Spirulina selenorganică - 1” sau „Spirulina selenorganică - 2”*

Pentru a obține aceste două produse, biomasa nativă de spirulină cu conținut sporit de seleniu se colectează în vase din sticlă cu capacitatea de 500 cm³ prevăzute cu dop ermetic, sau se plasează pe suporturi speciale și se supune procesului de uscare într-o instalație specială de uscare la temperatura și condițiile specificate în instrucțiunea atașată dispozitivului de uscare, până la asigurarea rezultatului final – obținerea unei pulberi.

În continuare, pulberea de biomasă selenorganică de spirulină se trece cantitativ câte 50 - 100 g în vase sau saci din polietilenă de capacitatea respectivă cantității de pulbere de spirulină selenorganică. Flacoanele și sacii se închid ermetic, se verifică în mod aleator etanșietatea ambalajelor. Ambalajele se etichetează. Eticheta va conține toată informația importantă și utilă consumatorului despre produs, conform legislației în vigoare pentru acest tip de produse.

Pulberea de spirulină selenorganică poate fi în continuare formulată în capsule sau comprimate. Atât în cazul pulberii de spirulină selenorganică, cât și în cazul celorlalte două forme se vor elabora și respecta specificațiile tehnice și normative pentru fabricarea în serie a acestor forme de produse în conformitate cu legislația în vigoare.

- B) *Biomasa de spirulină cu conținut sporit de seleniu - materie primă pentru fabricarea preparatelor selenorganice:*

II. Obținerea din biomasa de spirulină cu conținut sporit de seleniu a preparatelor selenorganice

La această etapă, la fel de complexă, se realizează procesul de obținere prin extragere și fracționare, din biomasa de spirulină cu conținut sporit de seleniu, a extractului de aminoacizi liberi și oligopeptide și a extractului proteic selenorganic. Procesul de obținere din biomasa de spirulină selenorganică a extractului de aminoacizi liberi și oligopeptide selenocomponente prevede extragerea din biomasa de spirulină a complexului de aminoacizi și oligopeptide selenocomponente, fracționarea, purificarea, condiționarea, ambalarea și etichetarea. Procesul de obținere din restul de biomasă de spirulină selenorganică (rezultată după extragerea aminoacizilor și oligopeptidelor) a extractului proteic selenocomponent realizează extragerea proteinelor selenocomponente, fracționarea, purificarea, condiționarea, ambalarea și etichetarea lor.

2.1 Fazele procesului tehnologic de obținere a extractului de aminoacizi liberi și oligopeptide selenorganice sunt următoarele:

2.1.1 Extragerea principiilor active (aminoacizi și oligopeptide selenocomponente) din biomasa de spirulină selenorganică: Biomasa nativă de spirulină selenorganică colectată se transferă din vasele de depozitare într-un vas din inox, sau material plastic atoxic, sau sticlă, se adaugă alcool de 30 - 85%, se amestecă bine, vasul se închide cu un capac și se supune extracției timp de 1 - 3 ore. Se verifică concentrația alcoolului și condițiile de extragere.

2.1.2 Fraționarea (separarea) principiilor active (aminoacizi și oligopeptide selenocomponente): Pentru fracționarea (separarea) principiilor active (aminoacizi și oligopeptide selenocomponente), amestecul biomasă + alcool se transferă în pahare de centrifugare și se centrifughează la centrifuga MPW-340 la 3500 rot/min timp de 30 min. După, extractul hidro-alcoolic ce conține aminoacizi și oligopeptide selenocomponente se colectează într-un vas din sticlă curat și se închide ermetic. Se verifică etanșietatea vasului cu extract.

2.1.3 Purificarea extractului hidro-alcoolic de aminoacizi și oligopeptide selenocomponente): Pentru purificarea extractului hidro-alcoolic ce conține aminoacizi și oligopeptide selenocomponente de pigmenți (derivații oxidați ai clorofilei), vasul se deschide și la extractul de principii active se adaugă talc (în rate, de două ori), se expune la întuneric timp de 8 - 16 ore, după care se centrifughează la 5000 rot/min., timp de 30 min. Extractul hidro-alcoolic de aminoacizi și oligopeptide selenocomponente purificat se colectează într-un vas curat și se închide ermetic. Se verifică etanșietatea vasului.

2.2 Fazele procesului tehnologic de obținere a extractului proteic selenocomponent sunt următoarele:

2.2.1 Extragerea proteinelor selenocomponente din restul de biomasă de spirulină: Într-un vas de volum corespunzător, la restul de biomasă (rezultat din producerea extractului de aminoacizi liberi și oligopeptide selenocomponente), în prealabil uscat la temperatura de 40 - 50 °C se adaugă sol. NaOH 0,45% în cantitate necesară și se amestecă. Vasul se plasează pe un agitator magnetic și se supune agitării timp de 30 min.

2.2.2 Separarea proteinelor - extract proteic selenorganic I: Amestecul de biomasă selenocomponentă + sol. NaOH se transferă în pahare de centrifugare și se centrifughează la 3500 rot/min, timp de 20 min. După, supernatantul - extract proteic selenorganic I se colectează într-un vas din sticlă curat, corespunzător volumului obținut și se închide ermetic.

2.2.3 Obținerea extractului proteic selenorganic II.

2.2.3.1 Extragerea repetată a proteinelor din restul de biomasă de spirulină selenocomponentă: Într-un vas de volum corespunzător, la restul de biomasă (rezultat din producerea extractului proteic selenocomponent I), se adaugă sol. NaOH 0,45% în cantitate

necesară și se amestecă. Vasul se plasează pe un agitator magnetic și se supune extracției prin agitare timp de 30 min.

2.2.3.2 Separarea proteinelor - extract proteic selenorganic II: Amestecul de biomasă selenocomponentă + sol. NaOH se transferă în pahare de centrifugare și se centrifughează la 3500 rot/min, timp de 20 min. După, supernatantul - extract proteic selenorganic II se colectează într-un vas de sticlă curat, corespunzător volumului obținut și se închide ermetic.

2.2.4 Purificarea extractului proteic - Extract proteic selenorganic sumar: Într-un vas de sticlă curat de volum corespunzător, extractele proteice selenorganice I și II se reunesc și se amestecă. Apoi, extractul proteic selenorganic sumar se supune purificării prin dializă până la pH 7,0 - 8,5, timp de 12 - 24 ore. După, extractul proteic selenorganic sumar se standardizează la o concentrație prestabilită și se colectează într-un vas de sticlă curat, corespunzător volumului obținut, se închide ermetic, se supune sterilizării, după care se etichetează.

2.3 Obținerea diverselor formule ale preparatelor selenocomponente în baza extractelor de aminoacizi și oligopeptide și a extractului proteic selenorganice. Condiționarea, ambalarea, etichetarea: Extractul de aminoacizi și oligopeptide este compoziția preparatelor cu denumirea comună „*BioR-Selenium*”. Forma de păstrare a acestor preparate este soluția alcoolică de o anumită concentrație a alcoolului (de la 30 la 50%), care la rândul ei poate fi utilizată pentru fabricarea altor forme și formule ale preparatului, astfel ca comprimatele sau capsulele. În aceste scopuri, soluțiile se procesează în continuare pentru a obține soluții injectabile, sau spray-ri, sau picături nazale. Pentru fiecare dintre forma de produs farmaceutic solicitată, soluția alcoolică de „*BioR-Selenium*” este prelucrată conform proceselor și documentației tehnice normative respective produsului fabricat. În cazul *Suplimentelor Se-proteice (pe baza extractelor proteice selenorganice)*, forma de păstrare este cea de soluție (apoasă), care se supune, pentru a fi păstrată, procesului de sterilizare în condiții stabilite. Ambele produse pot fi supuse procesului de pulberizare în instalații speciale, iar pulberea la rândul ei poate fi incapsulată sau comprimată. Procedura de condiționare, etichetare și ambalare este specifică fiecărui tip de produs și respectă toate cerințele în vigoare pentru fiecare dintre acestea.

2.4 Domenii de utilizare a produselor (preparatelor și suplimentelor selenorganice din spirulina):

Toate produsele obținute în cadrul fluxului tehnologic descris („*Spirulina selenorganică 1 și 2*”, „*BioR-Selenium 1 și 2*” și „*Supliment Se-proteic 1 și 2*”) sunt produse de origine vegetală ce constau dintr-o combinație sinergică dintre seleniul biotransformat de către spirulina și compușii săi biologic activi. Sunt cunoscute proprietățile compușilor biologic activi ai spirulinei, dar și funcțiile importante ale seleniului pentru organismul uman și cel animal. Printre

cele mai importante, atât pentru compușii biologic active din spirulina cât și pentru seleniu sunt: protecția antioxidantă, modularea răspunsului imun antiviral și antibacterian, diminuarea efectelor diferitor toxicanți. Toate acestea contribuie la prevenirea sensibilității organismului față de bolile cutanate, endocrine, ale tractului digestiv, hepatice, cardiovasculare, pulmonare, creșterea și dezvoltarea tumorilor, îmbolnăvirea mai rapidă și altor modificări degenerative legate de aceasta. Produsele pot fi utilizate pentru a regla nivelul hormonilor masculini și a asigura o bună funcționare a prostatei, precum și în alte stări în care produsele selenorganice din spirulină își pot aduce aportul benefic.

3.3.1 Testarea în condiții de producere în serie a tehnologiei de obținere a produselor (preparatelor și suplimentelor selenorganice) în baza biomasei de spirulină

O etapă importantă în introducerea tehnologiilor elaborate în fluxul industrial de fabricare este cea de testare a acestora în condiții cât mai apropiate celor de producere în serie. În acest scop, tehnologia de obținere a produselor (preparatelor și suplimentelor selenorganice) în baza, și din biomasa cu conținut sporit de seleniu produsă la cultivarea spirulinei în prezența selenitului de fier hexahidrat a fost testată la întreprinderea „FICOTEHFARM” SRL (or. Chișinău, R. Moldova). Au fost standardizate etapele proceselor de fabricare, stabilite procedurile premergătoare și cele caracteristice procesului de producere, stabiliți parametrii controlului interfazic și finit al produsului, etc.

În corespundere cu prescripția de referință (tehnologia elaborată), au fost monitorizați și analizați parametrii procesului de fabricare a materiei prime selenorganice: cantitatea de biomasă cu conținut sporit de seleniu produsă în procesul de cultivare a spirulinei conform condițiilor specifice de iluminare, temperatură, pH, cantitatea și calitatea biomasei cu conținut sporit de seleniu precum și: parametrii de extragere, purificare, standardizare pentru cele două materii prime active - extractul de aminoacizi și oligopeptide și extractul proteic selenocomponente. Nivelul creșterii culturii și cantitatea de biomasă cu conținut sporit de seleniu produsă au fost apreciate fotometric cu recalcul unităților de densitate optică în g/l biomasă absolut uscată, iar cantitatea de preparat - gravimetric. La standardizarea calității produselor selenorganice (preparate și suplimente) s-au utilizat metodele descrise în *cap. 2 al prezentei lucrări*.

În tab. 3.7 - 3.10 sunt generalizate rezultatele obținute la producerea în serie a biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu/*Spirulina selenorganică - 1*, a extractului de aminoacizi și oligopeptide selenocomponente (*BioR-Selenium 1*) și a extractului proteic selenorganic (*Supliment Se-proteic 1*).

Conform acestor rezultate, nu au fost stabilite devieri în ciclul tehnologic de fabricare. Atât după parametrii controlului interfazic (nivel producere biomasă selenorganică, parametri ai ciclului de producere a biomasei selenorganice), cât și după parametrii controlului finit: aspectul extern, compoziția biochimică a biomasei - aminoacizi liberi, oligopeptide, proteine, glucide și lipide, cantitatea de seleniu (tabelul 3.7 și tabelul 3.8). Acești indicatori s-au încadrat în limitele prescripțiilor date de tehnologiile elaborate. Compoziția produselor nu s-a modificat peste limitele prescripției de fabricare (nu a deviat cantitativ de la cantitățile produse în condiții de laborator).

Rezultatele obținute la testare au confirmat reproductibilitatea ciclului tehnologic de fabricare a ambelor extracte atât după parametri fizico - chimici: starea de agregare, mirosul, culoarea, cât și după compoziția lor: aminoacizi liberi, oligopeptide, proteine - cantitatea de seleniu, care s-au încadrat în limitele prescripțiilor date de tehnologia elaborată (tabelul 3.9 și tabelul 3.10). Principalii indicatori de calitate ai extractelor, la fel, nu s-au modificat peste limitele prescripției de fabricare.

Prin urmare, produsele elaborate, fabricate dintr-o cantitate mai mare de biomasă produsă la cultivarea spirulinei în fotobioreactoare de volum mare, nu prezintă modificări majore ale componentelor tehnologice, rezultatele încadrându-se în limitele prevăzute de specificația pentru aceste produse. Astfel, fabricarea lor în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Tabelul 3.7. Parametrii de control interfazic și finit în procesul de producere în serie a biomasei selenorganice de spirulină
(Spirulina selenorganică - 1)

Lotul fabricat	Durata ciclului de cultivare, ore	Interval monitorizare proces cultivare, ore	Parametrii monitorizați					Biomasa produsă, g
			Cantitatea de inoculum, g/l masă uscată	Temperatura, °C	Iluminarea, μM fotoni/m ² /s	pH-ul, unit. de pH	Nivelul creșterii culturii, g/l	
001 (FTF-SeBmSp)	144	48	0,425	28	37	8,0	0,70	110,0
		96		30	55	8,3	0,88	
		144		30	55	8,5	1,108	
Conform specificației elaborate	144	144	0,4-0,45	28-30	37-55	8,0-85	-	95,0-115,0

Tabelul 3.8. Parametrii de control calitate - interfazic și finit în procesul de producere în serie a biomasei selenorganice de spirulină
(Spirulina selenorganică - 1)

Lotul	Parametri fizico-chimici:		Parametri calitate, g/100g biomasă						
	Aspect extern	Concentrație, mg/ml	Aminoacizi, g/100g biomasă	Oligopeptide, g/100g biomasă	Proteine, g/100g biomasă	Glucide, g/100g biomasă	Lipide, g/100g biomasă	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS	Selen, g/100g biomasă
001 (FTF-SeBmSp)	Masă de culoare verde închisă cu nuanță albastră cu miros specific de alge	100,0	3,75±0,14	8,21±0,12	62,55±2,15	12,60±0,53	8,9±0,35	80,05±4,09	0,65±0,018
Condiții de admisibilitate (Conform specificației elaborate)	Masă (pastă) densă de culoare verde intensă, și/sau verde închisă și/sau verde închisă cu nuanță albastră cu miros caracteristic	100-105	3,5-4,0	8,0-8,5	50,0-55,0	12,50-13,00	9,0-8,0	75,0-85,0	0,60-0,70

Tabelul 3.9. Parametrii de control calitate - interfazic și finit în procesul de producere în serie a extractului de aminoacizi și oligopeptide selenorganice (BioR-Selenium 1)

Lotul	Parametrii fizico-chimici			Compoziție			
	Forma	Miros	Colorație	Identificare (Aminoacizi și oligopeptide)	Dozare		
					Aminoacizi și oligopeptide, mg/ml Cel puțin	Seleniu, μg/ml	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS
001- (FTF-ES-AAP/Se)	Corespunde	Corespunde	Corespunde	Col. albastru-violetă	0,50	12,5	75,0
Conform componentelor prescripției/ condiții de admisibilitate	Sol. alcoolică 50%	Specific extractului de aminoacizi și oligopeptide din spirulină	Verde cu nuanță cafenie sau cafenie cu nuanță verde, sau cafenie cu nuanță galbenă	Reacția calitativă cu soluție de ninhidrină. Apare col. albastru-violetă	0,45	10,0-15,0	75,0-80,0

Tabelul 3.10. Parametrii de control calitate - interfazic și finit în procesul de producere în serie a extractului proteic selenorganic (Supliment Se-proteic 1)

Lotul	Parametrii fizico-chimici			Compoziție		
	Forma	Gust și miros	Colorație	Proteine, mg/ml	Seleniu, μg/ml	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS
001 (FTF-ES-P/Se)	Corespunde	Corespunde	Corespunde	5,65±0,18	18,00	75,25
Conform componentelor prescripției/ condiții de admisibilitate	Lichid dens	Specific extractului proteic din spirulină	Verde cu nuanță cafenie sau cafenie cu nuanță verde, sau cafenie cu nuanță galbenă	4,70-5, 70	17,5-19,5	72,5-80,5

3.4 Concluzii la capitolul 3

1. Compușii anorganici ai Se (IV) modifică nivelul de producere a biomasei de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) în dependență de concentrația lor aplicată la cultivare. Selenitul de sodiu, selenitul de amoniu, selenitul de fier hexahidrat și selenura de germaniu preponderent stimulează (cu mici excepții - nu influențează) creșterea cantității de biomasă, pe când selenitul de cobalt și selenitul de zinc sunt toxici sau moderat toxici pentru cultura de spirulină [17].
2. Acumularea seleniului în biomasa de *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 este un proces doză-dependent. Nivelurile acumulate de seleniu în biomasă cresc la cultivarea ei în prezența compușilor în ordinea: $(\text{NH}_4)_2\text{SeO}_3 < \text{Na}_2\text{SeO}_3 < \text{CoSeO}_3 < \text{ZnSeO}_3 < \text{GeSe}_2 < \text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [17, 58].
3. Compușii anorganici ai seleniului testați în concentrațiile selectate influențează asupra activității biosintetice a tulpinii *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 prin sporirea conținutului de substanțe biologice active importante în biomasă, astfel ca proteinele, ficobiliproteinele (inclusiv ficocianina), glucidele, lipidele [5].
4. Compușii testați ai seleniului nu provoacă o creștere semnificativă a conținutului produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa tulpinii *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (chiar și la un conținut înalt al seleniului acumulat în biomasă) iar după datele testului cu utilizarea radicalului ABTS^{++} , efectul compușilor poate fi caracterizat ca netoxic sau moderat toxic [4].
5. O acumulare mai eficientă a seleniului în biomasa de spirulină se realizează la suplimentarea seleniului de fier hexahidrat în rate: $\frac{1}{2}$ (25 mg/l) în 1-a zi și $\frac{1}{2}$ (25 mg/l) în a 3-a zi de cultivare, precum și la adăugarea selenurii de germaniu în concentrație de 30 mg/l în a 3-a zi de cultivare. Conținutul seleniului este de circa 370 mg% și de circa 690 mg% dintre care circa 71 - 75% sunt repartizate în fracțiile biologice active ale biomasei (aminoacizi liberi și oligopeptide, proteine, glucide, lipide).
6. Prin schemele tehnologice elaborate se propune obținerea a 6 variante de preparate în baza biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu - materie primă eficientă, în cadrul unui singur flux tehnologic: „*Spirulina selenorganică 1 și 2*”, „*BioR-Selenium 1 și 2*” și „*Supliment Se-proteic 1 și 2*”. Fabricarea preparatelor în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

4. ELABORAREA BIOTEHNOLOGIEI DE OBȚINERE A PREPARATELOR CU CONȚINUT SPORIT DE GERMANIU ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ

Tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) poate fi valorificată și ca matrice pentru încorporarea germaniului în compușii săi biologic activi. Biomasa germaniuorganică și preparatele în bază de aceasta (ca și în cazul seleniului), pot fi fabricate în cadrul unui singur flux tehnologic. Pentru a realiza acest obiectiv major au fost parcurse etapele de cercetare, pe durata cărora:

- (1) A fost stabilit efectul unor compuși anorganici și organici ai Ge (IV) asupra capacității de producere a biomasei și de acumulare a germaniului de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11;
- (2) Au fost determinate modificările în compoziția biomasei (după componentele sale biologic active majore – proteinele, ficobiliproteinele, glucidele, lipidele) tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 cultivată în prezența compușilor germaniului utilizați în cercetare;
- (3) A fost elaborat procedeul de cultivare a tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 în condiții care asigură obținerea unei biomase cu conținut sporit de germaniu bioconvertit;
- (4) A fost elaborată schema tehnologică de obținere în cadrul unui singur circuit tehnologic a produselor (preparatelor și suplimentelor) ce conțin germaniu ca parte componentă efectivă.

4.1. Cantitatea de biomasă, nivelurile de acumulare a germaniului și compoziția biochimică a tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) la cultivare în prezența unor compuși anorganici și organici ai Ge (IV)

Datele din literatura de specialitate, cu privire la acumularea germaniului, precum și la acțiunea lui sau a compușilor săi asupra diferitor grupuri de microorganisme sunt mult mai puține și contradictorii, comparativ cu seleniul. Primele date se regăsesc în publicațiile din a doua jumătate a sec. XX și se referă la lipsa toxicității dioxidului de germaniu asupra ciupercii *Aspergillus niger*, aceasta fiind capabilă să acumuleze germaniul din acest compus [212]. Ulterior, într-un șir de alte studii s-a demonstrat capacitatea și a altor microorganisme (exm.: unele bacterii, cianobacterii, microalge verzi, levuri ș. a.) de a absorbi germaniul și de a-l acumula – capacitate oportună pentru a produce diverse preparate biologic active cu un conținut sporit al acestui oligoelement [65, 148, 182, 233, 253, 262, 289, 294].

Microalgele pot absorbi germaniul hidratat (din soluția apoasă de dioxid de germaniu) [35]. Pe exemplul diatomeelor s-a demonstrat dependența capacității de absorbție a germaniului nu numai de concentrația lui, dar și de raportul molar dintre acesta și siliciul prezent în mediul nutritiv al diatomeelor. Dacă acest raport este mai mic de 0,01, nu se observă nici un efect al germaniului asupra asimilării siliciului și creșterea diatomeelor: acestea absorb până la 80% din cantitatea de germaniu, care este fixat în membrana celulară. O creștere a raportului molar dintre germaniu și siliciu duce la inhibarea metabolismului siliciului în celula diatomeelor. Efectele rezultate din acest proces se manifestă prin afectarea dividerii celulare, inhibarea absorbției de siliciu și a metabolismului siliciului deja absorbit, inhibarea fotosintezei [35, 63, 151, 247]. A fost stabilită, de asemenea, reținerea creșterii diatomeelor, începând cu concentrația de 0,134 mg/l GeO_2 , iar concentrația de 1,0 mg/l GeO_2 reduce semnificativ creșterea acestor alge, pe când concentrația de 10 mg/l practic inhibă creșterea lor. Mai puțin sensibile au fost diatomeele, ale căror celule conțineau mai puțin de 1% SiO_2 , astfel nivelul de toxicitate al GeO_2 poate fi modificat prin adăugarea acestui compus al siliciului la mediul de cultivare. Această concluzie se bazează pe asemănarea proprietăților chimice ale siliciului și germaniului și se presupune, că toxicitatea germaniului se datorează inhibării selective a formării unei cochilii de siliciu în diatomee. Concentrații înalte de $\text{Ge}(\text{OH})_4$ în mediul acvatic au dus nu numai la inhibarea acumulării de siliciu, ci și la o perturbare a sintezei clorofilei și a absorbției fotosintetice a carbonului [90, 151, 168]. Pe de altă parte, dioxidul de germaniu nu inhibă creșterea algelor roșii (*Polysiphonia urecolata*, *Porphyra umbilicatis* și *Chondrus crispus*) [168].

La absorbția germaniului de către microalge, transportul lui se realizează împotriva gradientului de concentrație (fapt demonstrat pe diatomeea *Nitzschia alba*), rezultând o concentrație intracelulară de acid germanic de 3500 de ori mai mare decât concentrația lui în mediul acvatic. Transportul de germaniu este posibil cu utilizarea energiei metabolice, iar rata de absorbție a acidului germanic depinde de temperatură. Germaniul a fost determinat în peretele celular și, într-o măsură mai mică, în mitocondrii, cloroplaste, vezicule și microsomi [34].

Efectele exercitate la absorbția și acumularea germaniului (din GeO_2) de către microalge și cianobacterii (demonstrat pe *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis* sp., *Dicrateria zhanjiangensis*, *Chlorella ellipsoideae*, *Oscillatoria* sp. și *Spirulina platensis*), ca și în cazul altor microorganisme, depinde de un șir de factori, astfel ca: concentrația compusului introdus în mediu, particularitățile morfologice și fiziologo-biochimice caracteristice speciei/tulpinii, temperatura, pH-ul mediului și timpul de contact cu compusul [138, 274, 294].

Cercetările descrise în acest compartiment al lucrării au la bază, ca și în cazul seleniului, capacitatea tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) de a acumula

și biotransforma bioelementele, iar cantitatea lor poate fi sporită până la niveluri care nu afectează vădit calitatea biomasei ei.

Ca surse de germaniu au fost utilizați doi compuși anorganici, dioxidul de germaniu, cunoscut și valorificat mai pe larg până în prezent și selenura de germaniu cercetată de noi în premieră (care a fost precăutată de noi mai întâi în calitate de sursă de seleniu, *cap. 3*). De asemenea la cultivarea tulpinii de spirulină utilizată în această lucrare, asupra producerii de biomasă, capacității de acumulare a germaniului de către aceasta, precum și asupra compoziției ei biochimice a fost testat efectul unor compuși organici ai germaniului (IV) (*cap. 2*). Acești compuși, la fel, după un screening primar, au fost adăugați la mediul nutritiv modificat Zarrouk în concentrații de 10, 20 și 30 mg/l în prima zi de cultivare. Din cauza insolubilității compușilor organici în apă, înainte de utilizare aceștea au fost dizolvați în izopropanol. Aceeași cantitate de izopropanol a fost adăugată și la martor. Mediul nutritiv Zarrouk standard a fost utilizat în cazul dioxidului de germaniu. Pentru selenura de germaniu a fost utilizat mediul Zarrouk cu un conținut redus de bicarbonat de sodiu (2,0 g/l) și sulfati (0,5 g/l), dat fiind că acest compus a fost precăutat mai întâi ca sursă de seleniu. Acest mediu nutritiv se aplică în cazul cultivării spirulinei în condițiile de acumulare a seleniului (*cap.3*). În biomasa de spirulină obținută în aceste condiții a fost determinat conținutul germaniului. În continuare în *p. 4.1.1 - 4.1.3* al prezentului capitol, toți indicatorii de calitate sunt redați și analizați din punctul de vedere al conținutului germaniului acumulat în biomasa de spirulină din acest compus. Aceasta explică diferențele dintre eșantioanele martor pentru diferite substanțe.

4.1.1 Cantitatea de biomasă și conținutul de germaniu, acumulate de către A. platensis CNMN-CB-11 la cultivare în prezența unor compuși chimici ai Ge (IV)

În tabelul 4.1 sunt prezentate rezultatele experimentale asupra conținutului de germaniu determinat în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici și organici ai Ge (IV). Datele obținute demonstrează impactul major al compușilor anorganici, aceștia asigurând cele mai mari valori ale germaniului în biomasa spirulinei. Acumularea germaniului depinde de concentrația compusului chimic, introdusă în mediul de cultivare.

La creșterea concentrației compușilor de la 10 mg/l la 20 mg/l, conținutul de germaniu acumulat în biomasă s-a majorat cu circa 44 - 46%. Utilizat în concentrația de 30 mg/l, dioxidul de germaniu a sporit cu circa 14% conținutul germaniului în biomasă față de cea atestată la 20 mg/l, iar în cazul selenurii de germaniu – cu circa 36%. Comparativ cu dioxidul de germaniu, selenura de germaniu asigură acumularea unor niveluri mai înalte ale germaniului în biomasa de spirulină.

Tabelul 4.1. Conținutul germaniului acumulat în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici și organici ai Ge (IV)

Compusul	GeO ₂	GeSe ₂	FM-1	FM-2	FM-3	FM-8	FM-9	FM-10	FM-11
Concentrația	Ge acumulat, mg% biomasă								
10 mg/l	14,89	26,27	17,79	13,57	7,49	4,77	9,16	8,57	13,07
20 mg/l	26,74	48,53	20,69	22,29	17,36	8,48	10,52	17,41	18,35
30 mg/l	31,21	75,73	25,33	8,64	17,04	23,85	12,80	15,84	29,07

Compușii organici care conțin germaniu în structura sa, au indus acumularea unor cantități mai mici ale elementului, comparativ cu conținutul acestuia în compușii respectivi. În biomasa de spirulină au fost determinate între 9 și 29 mg% germaniu. Conținutul germaniului acumulat în biomasă, la fel, depinde de concentrația compusului în mediul de cultivare.

În continuare, cantitatea de germaniu acumulată a fost analizată în raport cu nivelul de biomasă produs de către spirulina. În figura 4.1 este redat conținutul de germaniu acumulat și cantitatea de biomasă produsă de către tulpina cianobacteriei *A. platensis* CNMN-CB-11 la cultivare în prezența compușilor anorganici și organici ai germaniului (IV). De rând cu cantitățile joase acumulate de germaniu, este mic și nivelul de producere a biomasei de către spirulina la cultivarea ei în prezența dioxidului de germaniu (figura 4.1A). La concentrația de 10 mg/l, producerea de biomasă a fost cu circa 5% mai scăzută, în comparație cu martorul. Odată cu creșterea concentrației compusului în mediu până la 20 mg/l, apoi până la 30 mg/l, conținutul de biomasă a scăzut și mai mult - cu până la 26%.

Selenura de germaniu - GeSe₂, analizată în această parte a lucrării ca sursă de germaniu, după cum s-a stabilit anterior (*p. 3.1.1, cap. 3*), a favorizat creșterea culturii sporind producerea de biomasă cu circa 19 - 25% față de martor (la concentrațiile de 10 și 20 mg/l) (figura 4.1A). Comparativ cu dioxidul de germaniu, spirulina a demonstrat și o capacitate mai accentuată de acumulare a germaniului din acest compus [74]. Conținutul maximal al germaniului de 75,73 mg% a fost determinat la concentrația de 30 mg/l a compusului, concentrație care nu a influențat producerea de biomasă. Este de menționat faptul, că la această concentrație a GeSe₂, în biomasa de spirulină se acumulează și o cantitate semnificativă de seleniu - circa 228 mg% (*p. 3.1.1, cap. 3*).

Compușii organici ai Ge (IV) au manifestat efecte variate asupra acumulării germaniului în biomasă (figura 4.1B). Compusul Mes₂GeCl₂ (FM-1) în toate cele trei concentrații testate a afectat producerea de biomasă, reducând cantitatea ei cu 11 - 16% în limita de concentrații aplicate. Nivelul elementului acumulat în biomasă a crescut însă, odată cu creșterea concentrației sale în mediul de cultivare [7], acumularea maximală de germaniu (25,33 mg%) fiind înregistrată la concentrația compusului de 30 mg/l.

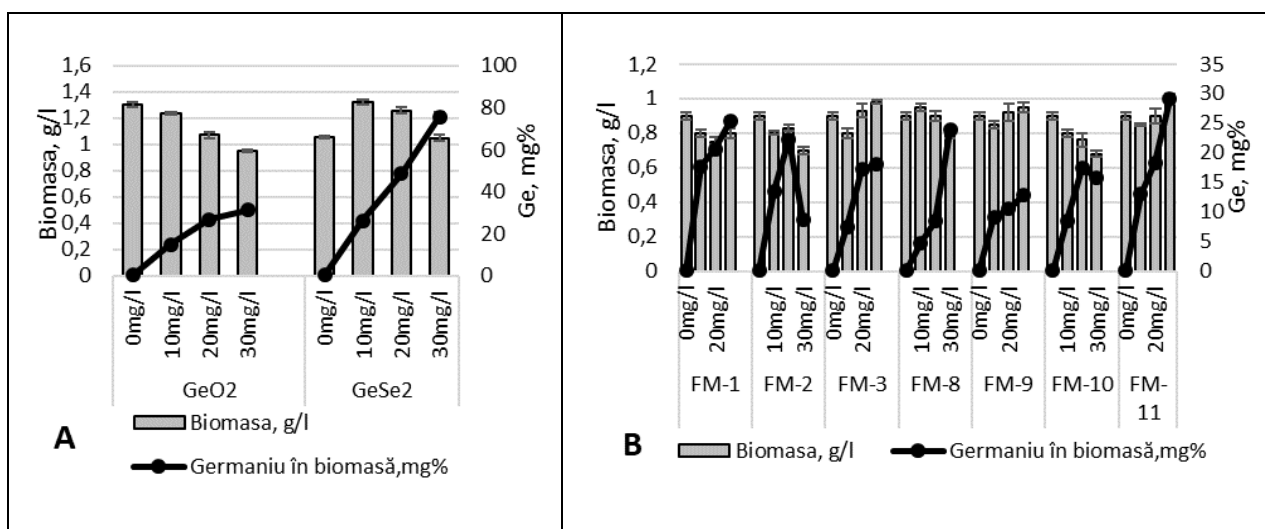


Fig. 4.1. Conținutul de germaniu acumulat (mg%) și cantitatea de biomasă (g/l), obținută la cultivarea spirulinei în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)

Compusul MesGe(OMe)_2 (FM-2), la fel, a indus o scădere cu 8 - 22% a nivelului de biomasă produsă, comparativ cu martorul. Cantitatea maximală de germaniu - 22,29 mg% a fost determinată la 20 mg/l MesGe(OMe)_2 , iar nivelul de producere a biomasei de spirulină la această concentrație a fost cu circa 7% mai scăzut, comparativ cu martorul. La concentrația compusului de 30 mg/l, conținutul germaniului a scăzut substanțial, atingând cota de 8,64 mg%, iar conținutul de biomasă a fost cu circa 22% sub limitele martorului, ceea ce demonstrează efectul toxic al compusului la utilizarea lui în concentrații mai mari.

Compusul $\text{ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu}$ (FM-3) a redus nivelul de producere a biomasei cu 11% la concentrația de 10 mg/l. Concentrațiile compusului de 20 mg/l și 30 mg/l nu au afectat producerea de biomasă de spirulină. În ceea ce privește acumularea de germaniu în biomasă, cantitatea maximală a elementului a fost de 18,07 mg% la concentrația compusului în mediul de cultivare de 30 mg/l, cu un nivel bun al biomasei produse.

Adăugarea compusului $\text{ArP=C(Te)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-8) în concentrațiile de 10 - 20 mg/l nu a modificat semnificativ producerea de biomasă. La concentrația de 30 mg/l, conținutul de biomasă a fost cu 11,1% mai scăzut, comparativ cu martorul, iar acumularea de germaniu a fost maximală și a constituit 23,86 mg% germaniu.

Compusul $\text{ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu}$ (FM-9) nu a favorizat acumularea germaniului în biomasă, dar nici nu a afectat productivitatea spirulinei. Pe fonul unei cantități de biomasă la nivelul martorului, cel mai înalt conținut de germaniu, de 18,07 mg%, a fost stabilit la concentrația compusului de 30 mg/l.

Pentru compusul $\text{ArP}=\text{C}(\text{PhCH}=\text{CHCHO})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (FM-10), maximumul acumulării germaniului în biomasă, de 17,49 mg%, a fost stabilit la concentrația lui de 20 mg/l. Asupra producerii de biomasă, acest compus a manifestat un efect inhibitor, care s-a intensificat odată cu mărirea concentrației lui în mediul de cultivare al spirulinei. Astfel, cel mai scăzut nivel al biomasei produse de către spirulina (cu 24%) a fost stabilit la 30 mg/l compus, concentrație la care s-a determinat și o scădere a conținutului de germaniu în biomasă.

Compusul $\text{Mes}_2\text{Ge}(\text{F})\text{-PHMes}$ (FM-11) a contribuit la o creștere cu circa 11% a cantității de biomasă la concentrația lui în mediul de cultivare al spirulinei de 30 mg/l, nivelul acumulat de germaniu în biomasă constituind 29,07 mg%. În concentrațiile de 10 și 20 mg/l, compusul nu a influențat producerea de biomasă de către cultura de spirulină.

Analiza corelațională a stabilit o dependență directă puternică $r^2 = 0,77 - 0,99$ dintre concentrația compușilor germaniului și acumularea bioelementului în biomasă în majoritatea cazurilor. O corelare slabă a fost determinată pentru compusul organic $\text{MesGe}(\text{OMe})_2$ (FM-2), pentru care concentrațiile înalte în mediul de cultivare au împiedicat acumularea germaniului în biomasă (tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Corelarea dintre concentrația compusului și conținutul germaniului acumulat în biomasă

Nr	Compusul	Coeficientul de determinare, R^2	Coeficientul de regresie, r^2
1	GeO_2	0,90	0,95
2	GeSe_2	0,97	0,98
3	FM-1	0,98	0,99
4	FM-2	0,13	0,36
5	FM-3	0,80	0,89
6	FM-8	0,89	0,95
7	FM-9	0,98	0,99
8	FM-10	0,58	0,77
9	FM-11	0,96	0,98

Astfel, efectele compușilor anorganici și organici ai germaniului (IV) asupra producerii de biomasă de către *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 pe fonul acumulării germaniului de către această tulpină, sunt diferite. Pentru majoritatea compușilor, în limitele de concentrații aplicate, a fost caracteristică lipsa efectului, sau efectul de diminuare a nivelului de producere a biomasei cianobacteriene. Tendința generală pentru acest proces în cazul celor doi compuși anorganici ai germaniului a fost cea de reducere a conținutului de biomasă odata cu creșterea concentrației compusului în mediu. În particular, în limitele concentrațiilor testate, dioxidul de germaniu a redus nivelul de biomasă cu valori pornind de la nivelul martorului (1,24 g/l la concentrația de 10 mg/l compus) și în descreștere pronunțată sub limitele fiziologice ale culturii de spirulină (0,95 g/l la concentrația de 30,0 mg/l compus). Pentru selenura de germaniu care a

fost o excepție, efectul exercitat asupra culturii fiind cel de stimulare a procesului de producere a biomasei, valorile au coborât de la 1,32 g/l biomasă (concentrația compusului de 10,0 mg/l) la 1,05 g/l (concentrația de 30,0 mg/l), care corespunde cantității de biomasă produsă la nivelul matorului. S-a demonstrat, că la concentrații de peste 30 mg/l, cultura de spirulină tinde spre formarea de conglomerate ca rezultat a includerii unor mecanisme de protecție împotriva efectelor toxice ale GeO_2 . Cu cât suprafața de contact cu substanța este mai mică, cu atât mai minor este impactul ei asupra culturii [330]. Ji-Xiang (1996) a stabilit că în intervalul de la 5,0 la 100,0 mg/l GeO_2 , *Spirulina platensis* crește în mod normal. La concentrațiile compusului mai mari de 100 mg/l, începe despiralarea spirulinei, filamentele devin fragmentate, iar cultura își pierde culoarea specifică. Concentrațiile optime de GeO_2 pentru spirulina au fost determinate nu mai mare de 35,0 mg/l [120]. O astfel de diferență în date se datorează probabil, atât particularităților tulpinilor de spirulină utilizate în studiile realizate, cât și condițiilor de cultivare aplicate.

Referitor la compușii organici ai Ge (IV), un efect toxic asupra producerii de biomasă l-au avut compușii FM-1, FM-2 și FM-10. Compușii organici FM-3, FM-8, FM-9 și FM-11 au produs efecte de scădere (care nu s-au dovedit dependente de concentrație), sau nu au influențat acest proces. Dintre compușii anorganici testați, în raport cu concentrațiile de compus introduse, cantitățile acumulate de germaniu au fost mai mari (circa 26 - 75 mg%) în biomasa de spirulină obținută la cultivare în prezența selenurii de germaniu, care la concentrația lui maximală aplicată nu a afectat cantitatea de biomasă produsă [305]. Pentru biomasa obținută la cultivarea spirulinei în prezența compușilor organici ai Ge (IV) nivelurile acumulate de germaniu au fost mult mai diminuate (circa 4 - 29 mg%). Prin urmare, selenura de germaniu poate fi utilizată nu numai pentru producerea unei biomase de spirulină îmbogățite cu seleniu (p. 3.1.1, cap. 3), dar și pentru obținerea biomasei îmbogățite cu germaniu [6, 308].

În prezența GeO_2 , germaniul se acumulează în biomasa spirulinei aproximativ de două ori mai puțin decât la adăugarea GeSe_2 , dar în același timp mai mult decât la utilizarea compușilor lui organici. Astfel, acest compus, de asemenea, ar putea fi utilizat pentru obținerea biomasei și a preparatelor ce conțin acest oligoelement [14, 76, 309].

4.1.2 Conținutul unor compuși biologic activi în biomasa de *A. platensis* CNMN-CB-11 cultivată în prezența compușilor anorganici și organici Ge (IV)

Prezența compușilor germaniului în mediul de cultivare, precum și cantitățile germaniului acumulat în biomasă pot modifica, ca și în cazul compușilor seleniului, activitatea biosintetică a culturii de spirulină. În scopuri tehnologice este foarte importantă nu numai păstrarea nivelului

favorabil de producere a biomasei pe fonul unor cantități sporite de germaniu acumulat, dar și păstrarea și/sau fortificarea componenței biochimice a acestei biomase.

În figura 4.2 este redată dinamica conținutului de proteine în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici și organici ai Ge (IV).

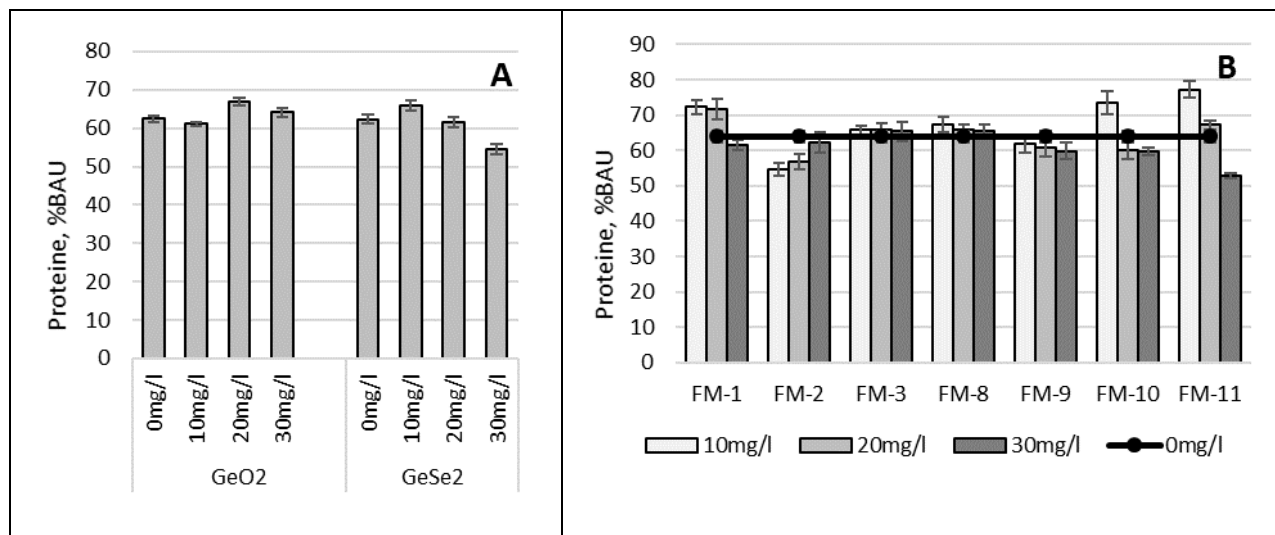


Fig. 4.2. Conținutul de proteine (% BAU) în biomasa de spirulină, cultivată în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)

Compusul GeO₂ nu a modificat esențial acumularea proteinelor în biomasa de spirulină. Doar la adăugarea lui în concentrația de 20 mg/l conținutul acestui indicator biochimic important al spirulinei a crescut nesemnificativ (cu 7,19%, comparativ cu martorul) la un nivel al germaniului acumulat în biomasă de 26,75 mg%. Pe fonul unei cantități de germaniu maximal acumulate, de 31,26 mg% (30 mg/l compus), conținutul de proteine s-a păstrat la nivelul biomasei obținute în condițiile standard de cultivare a spirulinei.

Compusul GeSe₂ în concentrație de 10 mg/l a contribuit la procesul de acumulare a proteinelor de către cultura de spirulină, însă la concentrația de 30 mg/l s-a observat o reducere cu circa 13% a conținutului de proteine în biomasă, pe fonul unei acumulări maxime a germaniului, de 75,73 mg%.

În cazul compușilor organici ai Ge (IV), pentru care au fost caracteristice niveluri mai joase de acumulare a germaniului, comparativ cu compușii anorganici ai lui, au fost determinate mai multe variante de răspuns la prezența lor în mediul de cultivare a spirulinei asupra procesului de sinteză a proteinelor (figura 4.2).

În prezența concentrațiilor de 10 și 20 mg/l Mes₂GeCl₂ (FM-1) a fost stabilită o creștere cu circa 13 și 12%, respectiv, a conținutului de proteine, în comparație cu martorul. La aceste concentrații ale compusului au fost determinate 17,73 mg% și 20,69 mg% germaniu în biomasă,

respectiv. Concentrația de 30 mg/l nu a modificat esențial conținutul de proteine (acesta oscilând în limitele matorului), pe fonul cantității acumulate de germaniu în biomasă de 25,33 mg%. În cazul dat, conținutul germaniului acumulat în biomasă nu a avut un careva impact asupra sintezei proteinelor de către spirulina.

Pentru compusul MesGe(OMe)_2 (FM-2) dependența efectului său inhibitor asupra acumulării de proteine de concentrațiile aplicate la mediul de cultivare este una inversă. Concentrația de 10 mg/l a redus cu 14,5% conținutul de proteine în biomasă, cantitatea germaniului acumulat fiind de 13,57 mg%. Modificarea conținutului de germaniu în biomasă, ca rezultat a creșterii concentrației compusului de la 10 mg/l la 30 mg/l nu a influențat însă, sinteza proteinelor, conținutul lor în biomasă fiind la nivelul matorului.

Compusul $\text{ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu}$ (FM-3), suplimentat la mediul de cultivare în concentrațiile de 10 - 30 mg/l, la aplicarea căruia a fost stabilită o acumulare a germaniului de 7,49 - 18,04 mg% nu a influențat asupra conținutului de proteine în biomasă, fiind atestate valori în limitele matorului.

Un efect similar a fost stabilit și pentru compusul $\text{ArP=C(Te)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-8) (figura 4.2).

În cazul compusului $\text{ArP=C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-9) a fost stabilită o tendință slabă de diminuare a conținutului de proteine, în dependență de concentrația compusului și conținutul elementului în biomasă.

Compusul $\text{ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-10) în concentrația de 10 mg/l a contribuit la o creștere cu circa 15% a conținutului de proteine în biomasa de spirulină. În concentrațiile de 20,0 mg/l și 30 mg/l, compusul dat a indus o scădere nesemnificativă, cu circa 7%, a nivelului de proteine.

Pentru compusul $\text{Mes}_2\text{Ge(F)-PHMes}$ (FM-11), concentrația de 10 mg/l a stimulat sinteza proteinelor: conținutul lor a crescut cu 12,9% în biomasă în comparație cu matorul. Concentrația de 30 mg/l a compusului a redus deja sinteza proteinelor cu 17,3%.

Așadar se poate rezuma faptul, că majoritatea compușilor organici ai germaniului luați în studiu nu contribuie în mod particular la acumularea de proteine în biomasa tulpinii cianobacteriei *A. platensis* CNMN-CB-11, cu excepția compușilor organici $\text{ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-10), $\text{Mes}_2\text{GeCl}_2$ (FM-1) și $\text{Mes}_2\text{Ge(F)-PHMes}$ (FM-11). Acești compuși organici ai germaniului, în concentrația de 10 mg/l au stimulat sinteza proteinelor în cultura spirulinei, cu circa 15%, 13% și cu circa 12%, respectiv. În condițiile date, spirulina a acumulat în biomasă circa 13 - 18 mg% germaniu. Ca și în cazul compușilor anorganici, pentru compușii organici nu a fost determinată o careva dependență dintre sinteza proteinelor și conținutul de germaniu acumulat în biomasa spirulinei [306].

Un indicator al implicării xenobioticelor în activitatea biochimică a spirulinei și care caracterizează răspunsul culturii la acțiunea lor, este conținutul de ficobiliproteine, componente ale sistemului său fotosintetic. Reducerea conținutului de ficobiliproteine la fel, este un indicator al toxicității compusului aplicat (concentrației lui înalte) pentru cultura cianobacteriană.

Compusul GeO_2 , în toate concentrațiile aplicate a contribuit la acumularea de ficobiliproteine în biomasa tulpinii cianobacteriei *A. platensis* CNMN-CB-11 (figura 4.3).

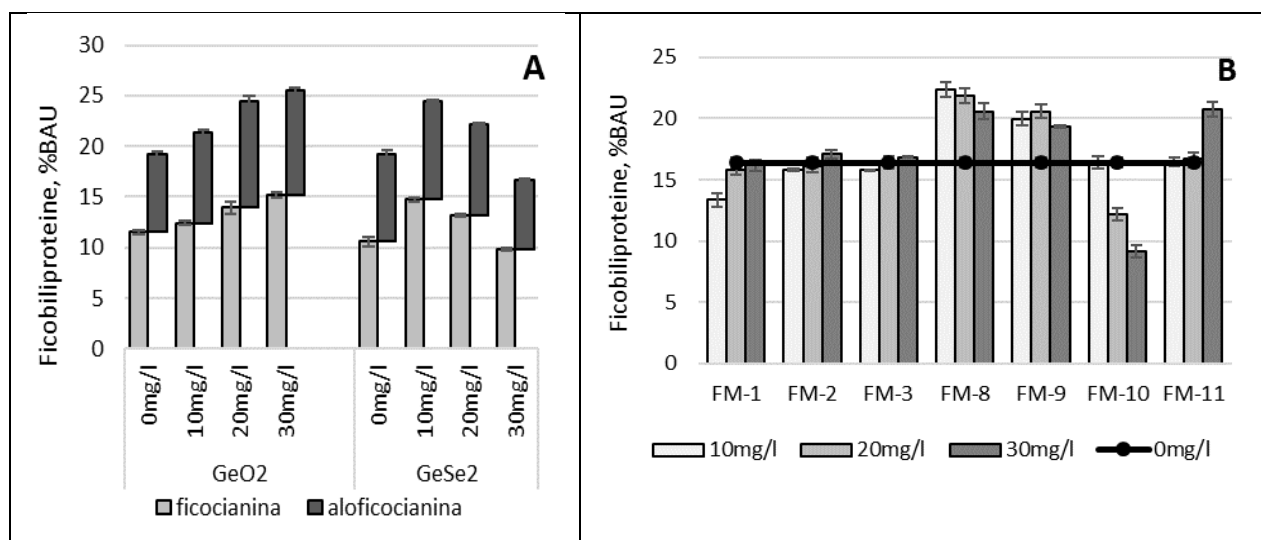


Fig. 4.3. Conținutul de ficobiliproteine (% BAU) în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)

La concentrația maximală de dioxid de germaniu - 30 mg/l, a fost determinat în biomasă un conținut al ficobiliproteinelor de 25,5%, ceea ce a depășit cu 32,68% conținutul acestor proteine-pigmenți în martor. Proprietatea dioxidului de germaniu de a stimula sinteza ficobiliproteinelor depinde de concentrația compusului în mediul de cultivare. S-a demonstrat, că ficocianina obținută din biomasa îmbogățită cu germaniu manifestă o capacitate antioxidantă semnificativă la determinare prin reacția cu ABTS^{+} comparativ cu ficocianina obținută din biomasa standard [1]. A fost stabilită o modificare în raportul dintre conținutul de ficocianină și cel de aloficocianină. Pentru concentrația de 30 mg/l GeO_2 a fost înregistrată cea mai înaltă cantitate de ficocianină în biomasă de 15,17%, ceea ce este cu 31,57% peste nivelul martorului. O creștere cu 36,93% a conținutului de aloficocianină a fost determinată pentru concentrația de 20 mg/l GeO_2 . Vom menționa, că la concentrațiile compusului GeO_2 pentru care a fost stabilită o creștere a conținutului de ficobiliproteine în biomasă, cantitatea de germaniu acumulat a fost relativ mică, între 14,89 mg% și 33,26 mg%, respectiv. Astfel, germaniul (cantitatea sa acumulată în biomasă) nu a avut un efect toxic oxidativ asupra culturii de spirulină.

Pentru compusul GeSe_2 efectul de stimulare a sintezei ficobiliproteinelor în cultura de spirulină a fost determinat pentru concentrația lui de 10 mg/l, conținutul ficobiliproteinelor în biomasa spirulinei constituind 24,49%, ceea ce este cu circa 18% mai mult, comparativ cu martorul. Odată cu creșterea concentrației compusului, conținutul de ficobiliproteine în biomasă a scăzut. Vom menționa, că la concentrația selenurii de germaniu de 30 mg/l la care a fost determinat un conținut mai înalt de germaniu (75,73 mg%), comparativ cu GeO_2 , cantitatea sumară de ficobiliproteine s-a redus în biomasă cu circa 19%. În acest caz, germaniul (cantitatea sa acumulată în biomasă) a manifestat un efect toxic oxidativ asupra culturii de spirulină. S-au stabilit modificările în spectrul polipeptidic al proteinei totale din biomasa de spirulină cultivată în prezența GeO_2 și GeSe_2 . S-au evidențiat două benzi intense cu masele moleculare de 20,5 kDa și 19,0 kDa, corespunzătoare subunităților α și β ale ficocianinei, care cantitativ sunt mult mai pronunțate, comparativ cu proba de referință, obținută din biomasa de spirulină cultivată în condiții standard [307].

Pentru compușii organici MesGe(OMe)_2 (FM-2) și $\text{ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu}$ (FM-3) în toate concentrațiile aplicate a fost determinat un conținut al ficobiliproteinelor în limitele martorului. Excepție a prezentat concentrația de 10 mg/l a $\text{Mes}_2\text{GeCl}_2$ (FM-1), la care conținutul de ficobiliproteine în biomasă a scăzut cu circa 19%.

Pentru compușii $\text{ArP=C(Te)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-8) și $\text{ArP=C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-9) a fost stabilit un efect de stimulare asupra procesului de sinteză a ficobiliproteinelor. Conținutul sumar al ficobiliproteinelor în biomasa de spirulină cultivată în prezența acestor compuși organici ai germaniului a crescut cu circa 17 - 36% față de martor, în funcție de concentrația aplicată de compus. În cazul acestor doi compuși organici ai germaniului, între conținutul de germaniu acumulat în biomasa de spirulină și cel acumulat de ficobiliproteine nu poate fi stabilită o careva dependență.

Efectul compusului $\text{ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-10) asupra procesului de sinteză a ficobiliproteinelor la tulpina de spirulină utilizată în cercetare a fost unul pronunțat negativ, cu excepția concentrației de 10 mg/l. La concentrațiile de 20 mg/l și 30 mg/l conținutul de ficobiliproteine s-a diminuat drastic, comparativ cu martorul - cu circa 25 și cu circa 44%, respectiv.

Compusul $\text{Mes}_2\text{Ge(F)-HMe}$ (FM-11) nu a modificat acumularea de ficobiliproteine în biomasa de spirulină în cazul primelor două concentrații de compus aplicate. Un conținut al ficobiliproteinelor cu circa 26% mai mult decât în martor a fost determinat la aplicarea concentrației de 30 mg/l compus.

Astfel, efectele compușilor germaniului, atât a celor anorganici, cât și celor organici asupra acumulării de ficobiliproteine la spirulina sunt diferite: de la stimulatoare, care nu modifică acest

proces și până la cele negative. În baza datelor obținute pot fi remarcăți compușii care au stimulat mai pronunțat procesul de sinteză a ficobiliproteinelor. Aceștia sunt: GeO_2 care a contribuit (în concentrație de 30 mg/l) la o sporire cu circa 32% a conținutului de ficobiliproteine și compușii organici $\text{ArP}=\text{C}(\text{Te})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (FM-8) și $\text{ArP}=\text{C}(\text{SeSe})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (FM-9) (în toate concentrațiile aplicate) care au asigurat o majorare a conținutului lor cu circa 18 - 36% peste nivelul matorului [306].

Un alt indicator, la fel de important, a valorii biochimice a biomasei de spirulină, este conținutul de glucide, valoarea cărora variază în dependență de necesitățile biosintetice ale culturii. În figura 4.4 este redată dinamica acumulării glucidelor în biomasă la cultivarea spirulinei în prezența compușilor anorganici și organici ai Ge (IV).

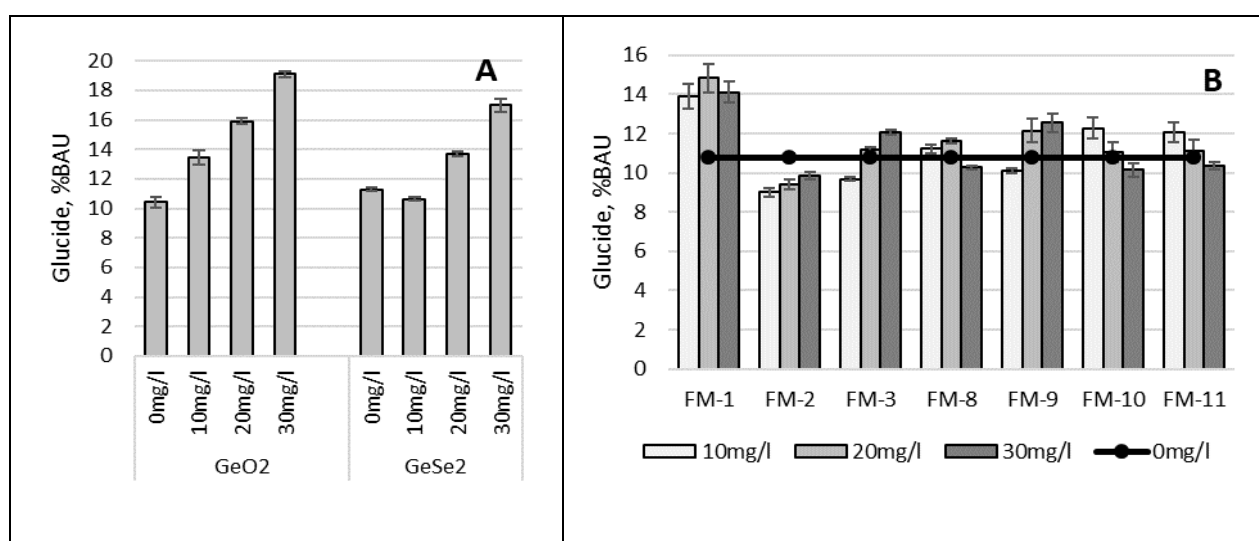


Fig. 4.4. Conținutul de glucide (% BAU) în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)

Pentru compușii anorganici ai germaniului a fost caracteristic un efect stimulator asupra sintezei glucidelor în cultura de spirulină (figura 4A). Astfel, conținutul maximal, de 19,1% glucide, a fost stabilit pentru concentrația de 30 mg/l dioxid de germaniu, ceea ce este cu 83,4% mai mult, comparativ cu matorul. În acest caz este evidentă dependența nivelului de acumulare a glucidelor de concentrația compusului din mediul de cultivare. În cazul selenurii de germaniu, sporul maximal de glucide în biomasă a fost de 50,3% pentru concentrația compusului de 30 mg/l. În cazul dat, se poate presupune și impactul germaniului acumulat în biomasă asupra sintezei glucidelor [74].

Dintre compușii organici ai germaniului (IV), doar compusul $\text{Mes}_2\text{GeCl}_2$ (FM-1) a stimulat sinteza glucidelor în toate concentrațiile lui aplicate (figura 4.3B). Conținutul maximal

al glucidelor, de 14,85%, ceea ce este cu circa 37% mai mult decât în martor, a fost determinat în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența concentrației compusului de 20 mg/l.

Sub influența celorlalți compuși organici ai Ge (IV), cu excepția MesGe(OMe)₂ (FM-2), în diferite concentrații ale lor, conținutul de glucide a avut doar o tendință nesemnificativă de sporire, sau s-au înregistrat valori în limitele martorului.

Compusul MesGe(OMe)₂ a manifestat un efect negativ asupra sintezei glucidelor, în biomasa de spirulină fiind determinat un conținut al lor cu circa 9 - 16% mai redus, decât cel caracteristic pentru spirulina cultivată în lipsă de compus.

Creșterea conținutului de glucide în biomasă este unul dintre mecanismele de adaptare a spirulinei la prezența în mediul de cultivare a compușilor Ge (IV). Luând în considerare un conținut crescut de ficobiliproteine, se poate presupune despre instalarea unui stres chimic reversibil în cultura de spirulină. Pentru a confirma, sau a infirma această presupunere, în biomasa de spirulină obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici și organici ai germaniului a fost analizat conținutul de lipide. Rezultatele obținute sunt reflectate grafic în figura 4.5.

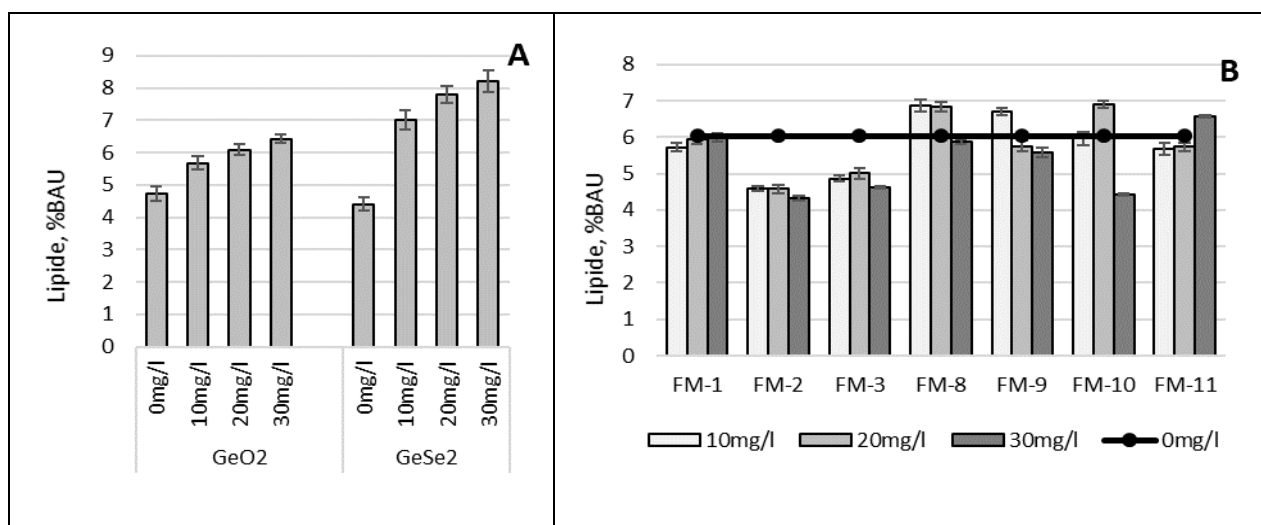


Fig. 4.5. Conținutul de lipide (% BAU) în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)

Rezultatele acțiunii dioxidului de germaniu asupra acumulării de lipide de către spirulina demonstrează un tablou similar celui modificării conținutului de glucide. Conținutul de lipide a crescut în biomasă în dependență de concentrația compusului din mediul de cultivare (respectiv, cantitatea germaniului acumulat în biomasă). Cantitatea maximală în biomasă, de 6,42% (ceea ce este cu circa 36% mai mare față de proba martor) a fost stabilită la concentrația de 30 mg/l dioxid de germaniu.

Niveluri mai înalte de acumulare a lipidelor au fost caracteristice pentru selenura de germaniu. În limitele concentrațiilor testate ale compusului, conținutul lipidelor în biomasă a constituit 7,01 - 8,21%, ceea ce este cu 58,99 - 86,17% mai mult decât cantitatea lor determinată în martor.

Compușii organici ai germaniului au modificat în diferite moduri conținutul de lipide în biomasa de spirulină (figura 4.5B). Conținutul de lipide nu s-a modificat în biomasa de spirulină, cultivată în prezența compusului $\text{Mes}_2\text{GeCl}_2$ (FM-1), indiferent de concentrația lui din mediul de cultivare.

Compușii $\text{MesGe}(\text{OMe})_2$ (FM-2) și $\text{ArP}=\text{C}(\text{Cl})\text{Ge}(\text{F})(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (FM-3) au redus cu circa 17 - 28% conținutul de lipide în biomasă. Nici concentrația compușilor, respectiv nici cantitatea de germaniu acumulat, nu au determinat nivelurile de acumulare a lipidelor în biomasă. Astfel, conținutul lipidelor a scăzut semnificativ la concentrația de 10 mg/l, la fel a fost mai scăzut acesta și la concentrația compușilor de 30 mg/l.

Compușii organici $\text{ArP}=\text{C}(\text{Te})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (FM-8) și $\text{ArP}=\text{C}(\text{SeSe})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (FM-9) au stimulat nesemnificativ acumularea de lipide de către cultura de spirulină (concentrațiile mai mici), sau nu au modificat acest proces (concentrația mai mare), conținutul de lipide menținându-se în biomasa de spirulină la nivelul normei lor fiziologice pentru cultură.

Pentru compusul $\text{ArP}=\text{C}(\text{PhCH}=\text{CHCHO})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (FM-10) efectul exercitat a fost dependent de concentrația utilizată. Astfel, aplicat în concentrația de 20 mg/l compusul a stimulat cu 14% acumularea de lipide, pe când în concentrația de 30 mg/l acesta a redus cu 26% conținutul lipidelor în biomasa de spirulină. Compusul coordinativ $\text{Mes}_2\text{Ge}(\text{F})\text{-HMes}$ (FM-11) nu a modificat nivelurile de acumulare a lipidelor în biomasa de spirulină.

Astfel, compușii anorganici GeO_2 și GeSe_2 în concentrațiile aplicate au indus acumularea unor cantități înalte de lipide în biomasa de spirulină. Acești doi compuși anorganici ai germaniului au determinat și acumularea unor cantități mai înalte de germaniu în biomasa de spirulină, ceea ce poate determina, într-o măsură oricare, formarea de radicali liberi. Dezvoltarea mecanismului de protecție antiradicalică include sinteza intensivă a lipidelor în scopul menținerii integrității membranare. Selenura de germaniu a indus o creștere cu circa 59 - 86% a conținutului de lipide și cu până la circa 50% a cantității de glucide. Conținutul înalt de lipide pe fonul cantității crescute de glucide în biomasă pot fi factori determinanți în instalarea stresului oxidativ.

Prin urmare, modificarea conținutului de lipide în biomasa de spirulină poate fi considerat un indicator al stresului oxidativ instalat. Acesta poate fi anihilat (prin concursul unor alte componente ale biomasei care au această proprietate distinctă), fapt demonstrat de cantitatea optimală de biomasă acumulată la cultivarea spirulinei în prezența unora dintre compușii

germaniului testați. Nu poate fi exclus nici efectul stimulator al acestor compuși asupra proceselor biosintetice la spirulina. În scopul confirmării ipotezelor expuse au fost determinate produsele degradării oxidative a lipidelor, conținutul cărora se modifică în dependență de capacitatea culturii de a rezista la producerea radicalilor liberi în rezultatul stresului instalat în cultură.

4.1.3 Conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasă și activitatea antioxidantă (în baza extractelor hidrice) a tulpinii cianobacteriei *A. platensis* CNMN-CB-11 cultivată în prezența compușilor Ge (IV)

Gradul de deteriorare oxidativă a culturii de spirulină în condițiile cultivării în prezența compușilor Ge (IV) poate fi determinat în baza acumulării produselor degradării acidului tiobarbituric.

Datele testului cu acidul tiobarbituric demonstrează o creștere a conținutului de dialdehidă malonică (DAM) în biomasă, obținută la cultivarea spirulinei în prezența compușilor Ge (IV) testați (figura 4.6).

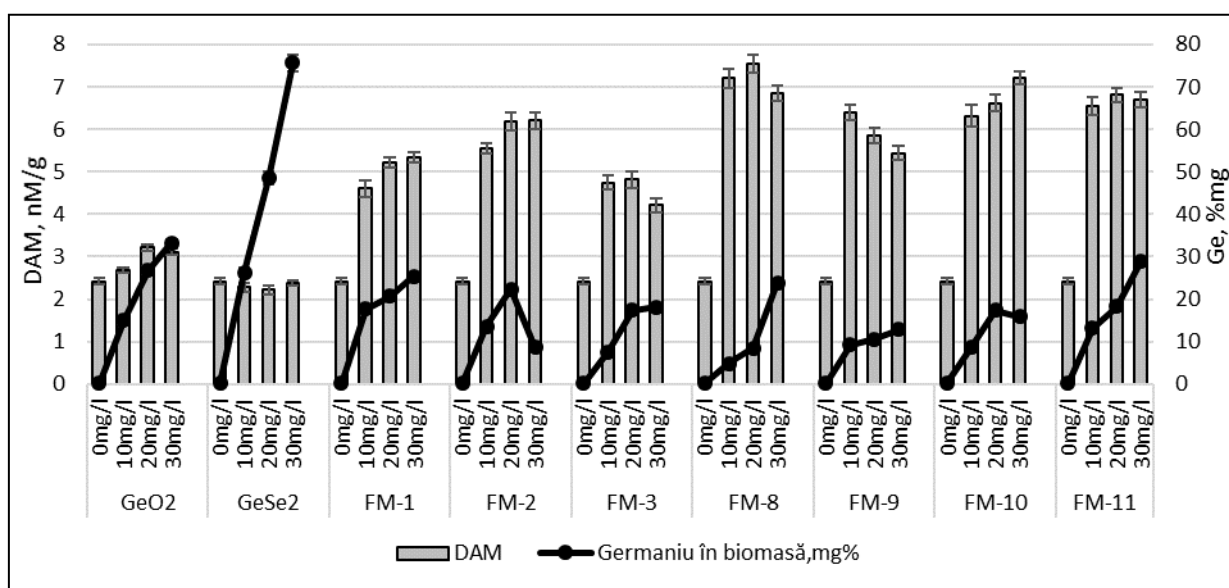


Fig. 4.6. Raportul dintre conținutul de dialdehidă malonică – DAM (nM/g) și nivelul de acumulare a germaniului (mg%) în biomasă de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)

Conținutul de DAM a fost mai crescut cu circa 28 - 33% la concentrațiile de 20-30 mg/l dioxid de germaniu administrat în mediul de cultivare. Cu circa 30% a crescut conținutul de DAM la utilizarea selenurii de germaniu în concentrație de 30 mg/l. Pentru concentrațiile

compusului de 10 mg/l și de 20 mg/l conținutul dialdehidei malonice a rămas la nivelul martorului.

La cultivarea spirulinei în prezența tuturor compușilor organici ai Ge (IV) testați și la toate concentrațiile lor aplicate, a fost determinată o creștere de 2 - 3 ori a conținutului de dialdehidă malonică în biomasa spirulinei. Valorile crescute ale testului DAM, determinate pentru compușii organici ai germaniului pot corela cu modificarea activității antioxidante, ceea ce poate fi dovada unui stres oxidativ instalat, care ar putea reduce din valoarea biomasei de spirulină. Au fost analizate modificările induse în nivelurile activității antioxidante a extractelor hidrice din biomasa de spirulină în corelare cu cantitatea de germaniu acumulat în biomasă (figura 4.7).

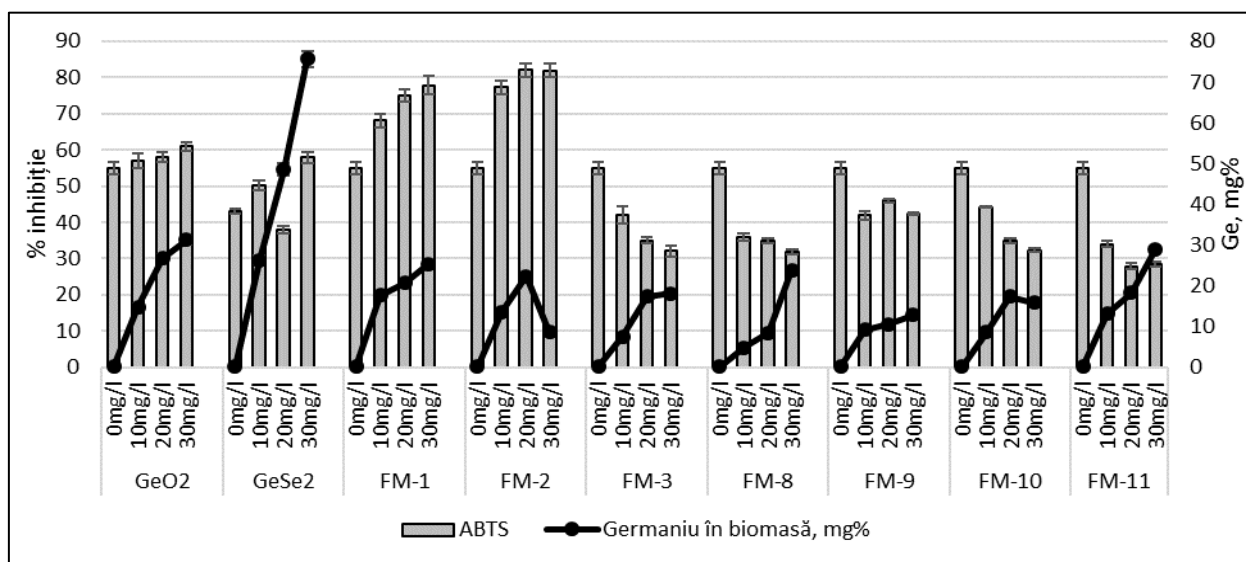


Fig. 4.7. Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS) a extractelor hidrice din biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența compușilor anorganici (A) și organici (B) ai Ge (IV)

Pentru a înțelege modul în care compușii anorganici și organici ai Ge (IV) influențează acest indicator monitorizat, a fost necesar să se analizeze nivelul acumulării germaniului de către spirulina în raport cu valorile activității antioxidante ale extractelor hidrice. În primul rând, au fost analizați cei doi compuși anorganici ai germaniului - GeO₂ și GeSe₂, care în concentrația de 30 mg/l au asigurat cel mai înalt nivel de acumulare a germaniului, 31,2 mg% și 75,7 mg%, respectiv. Odată cu creșterea conținutului de germaniu acumulat în biomasă, la adăugarea de GeO₂, crește și activitatea antioxidantă a extractelor hidrice, dar această creștere nu este atât de semnificativă (cu doar 3,6 - 10,9% față de martor), ceea ce indică asupra faptului că cultura nu este afectată de un stres oxidativ puternic. În cazul acumulării unui conținut mai ridicat de

germaniu în biomasa de spirulină în prezența compusului anorganic GeSe_2 , reacția culturii de spirulină poate explicată în felul următor. Acumularea de germaniu până la 48,5 mg% în cazul aplicării concentrației de 20 mg/l selenură de germaniu a contribuit la o scădere a activității antioxidante cu circa 31% față de martor. Creșterea în continuare a conținutului de germaniu în biomasă până la valoarea de 75,73 mg% a condus la restabilirea activității antioxidante a spirulinei, ceea ce demonstrează viabilitatea culturii în condițiile unui stres oxidativ, probabil condiționat de acumularea de germaniu în biomasă.

În ceea ce privește activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa obținută la cultivarea spirulinei în prezența compușilor organici care conțin Ge (IV), valorile testului ABTS fie cresc, fie scad semnificativ în dependență de compusul administrat. Astfel, acumularea de germaniu la adăugarea de $\text{Mes}_2\text{GeCl}_2$ (FM-1), este însoțită de o creștere considerabilă a activității antioxidante, și cu cât concentrația compusului în mediul de cultivare și, respectiv acumularea acestuia este mai mare (de la 17,7 mg% până la 25,3 mg%), cu atât este mai mare activitatea antioxidantă (cu 23,6% - 41,8% mai mare față de martor), ceea ce sugerează ideea unui stres oxidativ continuu. În cazul compusului MesGe(OMe)_2 (FM-2), activitatea antioxidantă crește cu circa 50%, fiind similară cu cea a compusului FM-1. Acumularea germaniului în biomasă nu determină creșterea activității antioxidante. Cea mai mare valoare a testului ABTS, de 82% inhibiție, a fost determinată la concentrația compusului de 30 mg/l la un conținut minimal de germaniu acumulat în biomasă (8,64 mg%). În cazul aplicării compusului $\text{ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu}$ - (FM-3), activitatea antioxidantă a extractelor hidrice a fost scăzută pe fonul unei cantități de germaniu acumulat în biomasă relativ mică (între 7,49 și 18,04 mg%).

Complexitatea compușilor organici aplicați este un impediment în stabilirea unei relații dintre cantitatea germaniului acumulat și modificarea valorilor testului ABTS. Pentru majoritatea compușilor organici aplicați se poate observa o dependență dintre concentrația compusului în mediul de cultivare și valorile testului ABTS. Un tablou similar a fost caracteristic și pentru compușii $\text{ArP=C(Cl)Ge(F)(Tip)t-Bu}$ (FM-3), $\text{ArP=C(Te)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-8), $\text{ArP=C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-9), $\text{ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu}$ (FM-10) și $\text{Mes}_2\text{Ge(F)-PHMes}$ (FM-11). Pentru aceștia, indiferent de conținutul de germaniu acumulat, activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasa de spirulină a fost cu peste 50% mai mică, comparativ cu martorul.

Modificarea valorilor testului antioxidant ABTS indică o stare de stres instalat în cultura de spirulină. Compușii organici ai germaniului conțin componentul organic fenil (Mes - 2, 4, 6-trimetilfenil; Ar - 2, 4, 6-tributilfenil; Tip - 2, 4, 6-izopropilfenil), radical foarte activ, prezența căruia probabil a indus stresul oxidativ în cultura de spirulină.

Valorile crescute ale testului antioxidant ABTS reprezintă rezultatul creșterii conținutului de compuși antioxidanți ca răspuns la acumularea de radicali în cultura de spirulină, iar valorile joase ale activității antioxidante pot fi rezultatul: 1) utilizării active a antioxidanților sau 2) incapacității culturii de a menține statutul antioxidant stabil. În cazul compușilor organici care conțin germaniul, nu au fost stabiliți indicatori ai proceselor de deteriorare a capacității biosintetice. Prin urmare, este vorba despre un consum sporit de compuși antioxidanți în scopul menținerii integrității proceselor vitale din celulă. Valorile joase ale dialdehidei malonice în corelare cu modificarea neînsemnată a activității antioxidante este dovada capacității de adaptare a culturii de spirulină la stresul indus de prezența în mediul de cultivare a compușilor germaniului.

4.2. Procedeu de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de germaniu

Sursa de germaniu care a asigurat acumularea lui cea mai eficientă dintre toți compușii anorganici și organici ai Ge (IV) testați este selenura de germaniu. În biomasa de spirulina cultivată în prezența acestui compus în concentrație de 30 mg/l a fost determinat un conținut al germaniului de circa 75,7 mg%. Pe fondul acestei cantități acumulate de germaniu, nivelul de biomasă produs de către spirulina este în limitele caracteristice producerii biomasei în condiții standard.

Procesul de absorbție și de acumulare a germaniului de către spirulina depinde nu numai de concentrația introdusă și/sau natura compusului lui, ci și de alți factori. În cazul tulpinii de spirulină incluse în acest studiu, dependența de concentrație a cantității acumulate de germaniu de concentrația compusului a fost clară doar în prezența compușilor anorganici aplicați, în particular a selenurii de germaniu. În cazul compușilor organici acest proces implică și structura chimică a lor.

Comparativ cu seleniul (pentru acumularea căruia este esențială menținerea pH-ului la valoarea de 8,0 - 8,5), condițiile care pot asigura acumularea unor cantități mai mari de germaniu de către spirulina prezintă alte particularități. Spre deosebire de seleniu, pentru o rată mai mare de acumulare a germaniului este important de a asigura o alcalinitate mai înaltă a mediului de cultivare (chiar peste 9,5). În aceste condiții, germaniul trece în forma de ioni HGeO_3^- , ușor absorbită de celulele vii [96, 274, 294]. Acumularea germaniului de către celulele spirulinei depinde în mod substanțial și de regimul de temperatură utilizat. Astfel, raportul dintre conținutul germaniului complexat cu proteinele, lipidele și glucidele, determinat pentru spirulina crescută la 25 °C a fost de aproximativ 48%, iar pentru spirulina crescută la 30 °C raportul a crescut până la 72,0% [262]. În procesul de obținere a biomasei de spirulină îmbogățită cu acest oligoelement

este important, astfel, de a se ține cont nu numai de condițiile care asigură acumularea lui în biomasă, dar și de condițiile care asigură complexarea lui cu compușii macromoleculari ai spirulinei (proteinele, glucidele, lipidele). Tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 (spirulina) este o tulpină tehnologică cu o capacitate prestabilită de a acumula bioelementele [56, 58], pentru care este elaborat un mediu de cultivare cu un raport echilibrat și optimal al macro- și micronutrienților. pH-ul mediului pe durata cultivării are o alcalinitate pornind de la 8,5 unități de pH și atinge o alcalinitate de 10,5 unități de pH pe final de ciclu de cultivare, iar temperatura optimală de creștere este de 30 °C. În continuare, pentru a asigura aceste condiții de acumulare a germaniului tulpina a fost cultivată cu respectarea parametrilor indicați ai procesului, iar în cadrul acestuia s-a manipulat cu intervalul de administrare a concentrației selenurii de germaniu care asigură acumularea unor cantități importante anume de germaniu. Concentrația de selenură de germaniu nu a fost majorată din considerentele respectării unui anumit nivel al calității biomasei îmbogățite cu germaniu. Din datele obținute asupra compoziției biochimice a spirulinei, cultivată în prezența acestui compus, reiese că mărirea în continuare a concentrației de compus poate afecta calitatea biomasei (reducerea conținutului de proteine, ficobiliproteine – compuși importanți în biotransformarea bioelementelor). Astfel, compusul a fost administrat în concentrația de 30 mg/l în rate și la diferite intervale de creștere a culturii: concentrația de 15 mg/l a fost suplimentată în prima zi de cultivare și o altă concentrație de 15 mg/l a fost administrată la cultura de spirulină în creștere la a treia zi de cultivare. O altă variantă a fost cea de administrare a selenurii de germaniu în concentrația de 30 mg/l la a treia zi de cultivare (tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Nivelul de producere a biomasei (% Martor) și conținutul de germaniu acumulat (mg%) la cultivarea spirulinei în prezența selenurii de germaniu suplimentată în concentrație de 30 mg/l în diferite intervale ale procesului de cultivare

Perioada de suplimentare a compusului seleniului	Biomasa, %M	Cantitatea de germaniu în biomasă, mg%
15 mg/l (1-a zi de cultivare) 15 mg/l (3-a zi de cultivare)	99,99	90,55±2,14
3-a zi de cultivare	100,53	80,60±1,56
1-a zi de cultivare	100,95	75,73±1,97
Martor	100,00 (1,04±0,012)	0,11±0,02

Drept rezultat, suplimentarea selenurii de germaniu în rate și la diferite intervale de cultivare a spirulinei asigură obținerea unei biomase cu un conținut mai ridicat al germaniului, de 90,55 mg%, comparativ cu cantitatea lui de 80,6 mg%, care s-a obținut la administrarea compusului în a treia zi și cu 75,73 mg% determinate în biomasa obținută la cultivarea spirulinei

în prezența selenurii de germaniu adăugate în aceeași concentrație în prima zi de creștere a culturii.

Repartizarea germaniului în fracțiile de compuși biologic activi ai spirulinei cultivate în condițiile descrise de administrare a selenurii de germaniu este redată în figura 4.8.

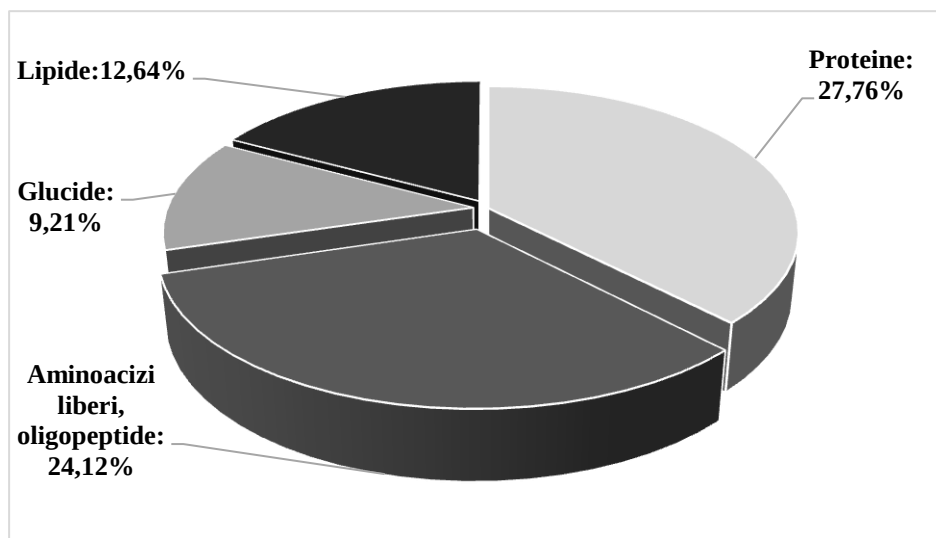


Fig. 4.8. Repartizarea germaniului în diferite fracții biologic active ale biomasei de spirulină cu conținut sporit de germaniu

Din conținutul total al germaniului acumulat în biomasa de spirulină, 27,76% au fost determinate în fracția proteică, 24,12% în fracția ce conține aminoacizi în stare liberă și în componența oligopeptidelor din spirulină, 9,21% în fracția de glucide și 12,64% - în fracția lipidelor. Așadar, suplimentarea selenurii de germaniu *în rate și la diferite perioade de creștere* ale culturii de spirulină, asigură obținerea unei biomase îmbogățite cu germaniu (circa 90 mg%), iar acesta este încorporat în cantități înalte (circa 66 mg% sau 73% total) în fracțiile ce conțin majoritar compușii săi biologic acivi importanți. Procesul de obținere a biomasei ce conține germaniu biotransformat poate fi realizat după schema redată în figura 4.9 și în succesiunea operațională descrisă în continuare:

(1) Se prepară mediul nutritiv ce conține macronutrienții (g/l): NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -8,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -1,0; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,20; CaCl_2 -0,024; FeEDTA -1 ml/l; 1 ml/l soluție de micronutrienți ce conține (mg/l): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015).

(2) La mediul nutritiv preparat se adaugă soluție de selenură de germaniu cu concentrația de 15,0 mg/l.

(3) În mediul nutritiv ce conține sursa de germaniu se inoculează volumul de cultură de spirulină ce corespunde concentrației celulelor culturii între 0,4 și 0,45 g/l masă uscată.

(4) Cultura de spirulină se repartizează în vasele de cultivare de capacități care asigură obținerea biomasei în cantități prestabilite și spirulina se cultivă timp de 2 zile (48 ore) respectând parametrii: temperatura 28 °C, iluminarea~37 μM fotoni/ m^2/s ; pH-ul = 8,5.

(5) La a 3-a zi de cultivare, la cultura de spirulină se adaugă soluție de selenură de germaniu cu concentrația de 15,0 mg/l și spirulina se cultivă pe durata a încă 4 zile (96 ore) cu menținerea parametrilor: temperatura 30 °C, iluminarea~55 μM fotoni/ m^2/s ; pH-ul = 9,0 - 10,5.

(6) La a 6-a zi de cultivare (sfârșitul procesului de cultivare), cultura de spirulină se separă de mediul de cultură prin filtrare, iar biomasa rezultată pe filtru se spală cu o soluție de acetat de amoniu de 1,5% pentru a înlătura sărurile restante pe suprafața celulelor după care se mai spală o dată cu apă purificată sau distilată.

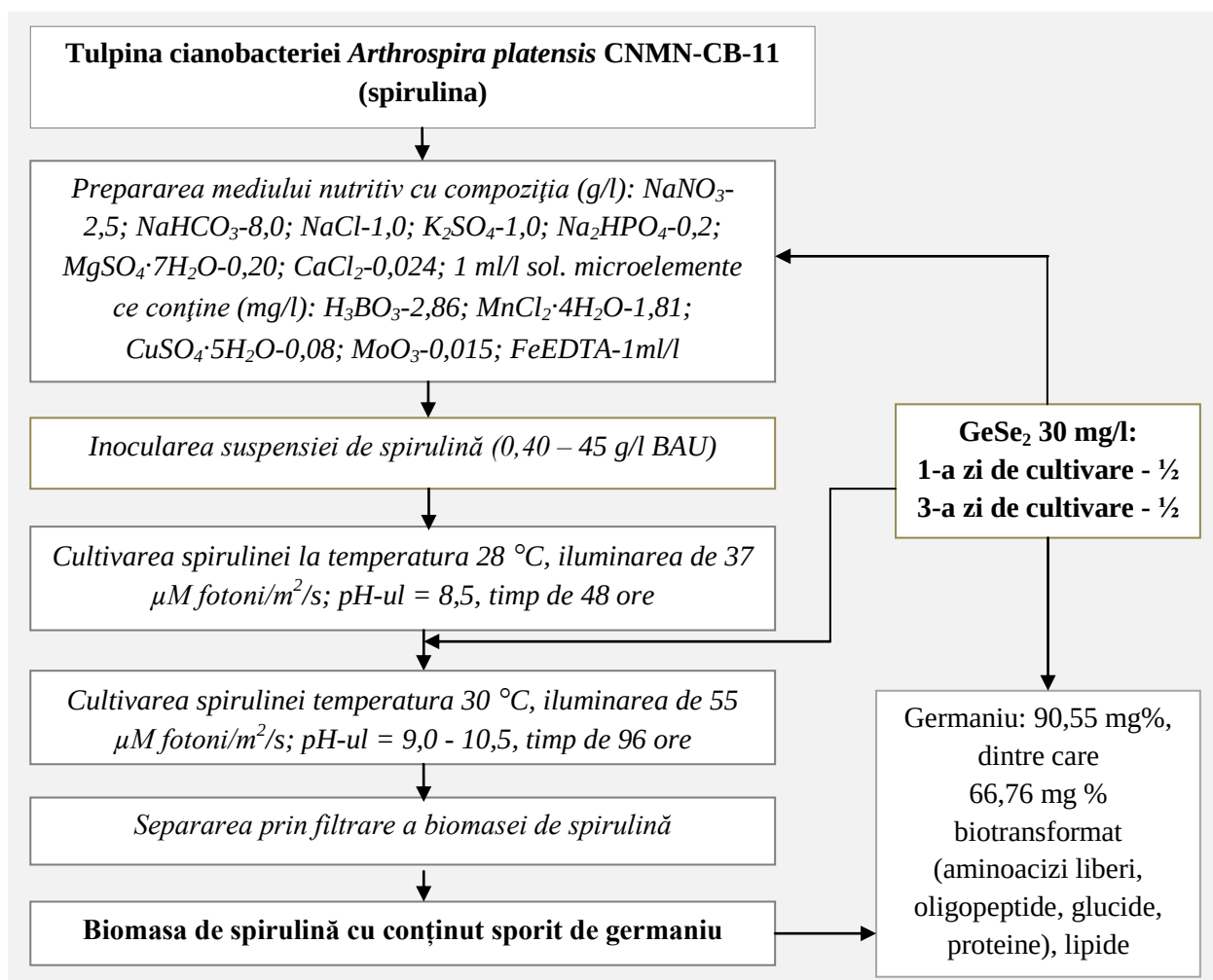


Fig. 4.9. Schema de obținere a biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu

Biomasa se standardizează la o anumită concentrație și se determină cantitatea de germaniu și principalii indicatori de calitate (compuși biologic activi, conținutul de DAM sau activitatea antioxidantă) în cazul când este procesată în continuare pentru obținerea unor preparate ce conțin germaniu biotransformat, sau se usucă și biomasa se utilizează ca produs germaniuorganic.

4.3. Tehnologia integrată de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de germaniu (sau germaniu și seleniu)

Biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu demonstrează o compoziție a sa destul de echilibrată, în comparație cu cea obținută în condiții standard de cultivare. Astfel, biomasa germaniucomponentă conține 3,5% aminoacizi liberi (față de 3,0%), 6,8% oligopeptide (față de 8,0%), 60,5% proteine (față de 64,5%), 8,25% C-ficocianină (față de 9,15%), 15,75% glucide (față de 12,5%) și 8,0% lipide (față de 5,15%). Activitatea antioxidantă a fost determinată în extractele hidro-alcoolice de 50% obținute din această biomasă, de asemenea, prezintă un nivel bun (tabelul 4.4).

Tabelul 4.4. Conținutul unor compuși biologic activi în biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu

Compoziție	Spirulina germaniuorganică	Spirulina
Aminoacizi liberi	3,50%	3,0%
Oligopeptide	6,80%	8,0%
Proteine	60,5%	64,5%
Ficobiliproteine	16,40%	18,0%
C-Ficocianina	8,25%	9,15%
Glucide	15,75%	12,5%
Lipide	8,0%	5,15%
Germaniu	0,090%	0,00011%
Activitatea antioxidantă	67,5%	65,2%

Ca și în cazul biomasei de spirulină îmbogățite cu seleniu, biomasa de spirulină cu conținut sporit de germaniu poate fi (1) valorificată și (2) procesată în cadrul unui singur flux tehnologic pentru obținerea produselor (preparatelor și suplimentelor) germaniucomponente, conform etapelor redată în figura 4.11.

Circuitul tehnologic începe astfel, de la *producerea materiei prime germaniuorganice* – biomasa de spirulină cu conținut sporit de germaniu care se obține conform procedului elaborat (figura 4.10), iar în cadrul acestui segment tehnologic se respectă toate elementele componente

care asigură rezultatul final: inofensivitatea mediului nutritiv și cantitatea de cultură start de spirulină care vor asigura inițierea procesului tehnologic, respectarea prescripției de introducere a sursei de germaniu, respectarea parametrilor care creează condiții optime de acumulare a germaniului, în particular, temperatura și pH-ul procesului de cultivare, monitorizarea acestor parametri dar și a culturii de spirulină pe durata cultivării pentru a evita instalarea unui stres tehnologic pe parcursul producerii, respectarea cerințelor față de procedura de filtrare a culturii la finalul cultivării și de standardizare a concentrației biomasei, stabilirea parametrilor de calitate (cantitatea de germaniu și conținutul principalilor indicatori de calitate ai biomasei). *Rezultatul final* al acestei secvențe tehnologice este biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu care ulterior poate fi valorificată pe două căi:

(1) Biomasa, pornind de la compoziție și germaniul biotransformat de către compușii săi biologic activi, conform unor proceduri specifice (uscare, pulberizare, condiționare, ambalare) se formulează ca adaos/supliment alimentar cu denumirea convențională „*Spirulina germaniuorganică*”

sau

(2) Biomasa ce conține germaniu biotransformat (cu masa standardizată și indicii de calitate stabiliți) se transferă, în calitate de materie primă la următorul segment – fabricarea dintr-o singură biomasă prin extragere succesivă a preparatelor și suplimentelor proteice germaniucomponente. Acest segment tehnologic este unul foarte complex și conține două secvențe: obținerea extractului de aminoacizi liberi și oligopeptide la prima etapă și obținerea extractului proteic din restul de biomasă procesat la prima etapă, în cadrul celei de a doua etape a fluxului tehnologic.

În cadrul *primei secvențe tehnologice* biomasa germaniuorganică se tratează cu soluții alcoolice cu un conținut de alcool de la 30% până la 85%, se supune extragerii pe o anumită durată de timp determinată la întuneric, după care amestecul biomasă + alcool se centrifughează și astfel se separă extractul de aminoacizi și oligopeptide. Extractul se supune purificării – se înlătură derivatele oxidate ale clorofilei, după care acesta se standardizează după concentrație, se determină conținutul de germaniu și de aminoacizi liberi și oligopeptide, se verifică și se rectifică concentrația alcoolului.

Rezultatul final al acestei secvențe - Extractul de aminoacizi și oligopeptide germaniucomponente care, după aplicarea unor proceduri de purificare, standardizare, formulare, condiționare și ambalare este formula preparatului biologic activ ce conține germaniul ca parte componentă efectivă sub denumirea „*BioR-Germanium*”.

supune dializei până la pH-ul 7,0 - 8,5 după care se standardizează la o anumită concentrație și se determină conținutul de germaniu și de proteine în acesta. Extractul proteic germaniucumponent care este *produsul final* al acestei secvențe, la fel, după aplicarea procedurilor specifice fiecărei forme (pulbere încapsulată sau comprimate sau lichid) reprezintă formula pentru preparatul „*Supliment Ge-proteic*”.

Domeniile, dozele și modul de utilizare/administrare a produselor germaniucumponente obținute în baza biomasei de spirulină în cadrul acestei tehnologii complexe reiese din fiecare caz concret și situație/afecțiune, luând în considerare atât starea clinică, cât și profilul terapeutic pe care pot să-l asigure sau să-l completeze fiecare dintre aceste produse elaborate pornind, în primul rând, de la proprietățile lor asigurate atât de germaniu, cât și prin synergism cu acesta a compușilor biologic activi din spirulina.

4.3.1. Reproducerea fluxului tehnologic de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de germaniu în condiții de producere în serie

Circuitul tehnologic de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu conținut sporit de germaniu (ca și în cazul produselor seleniucumponente), a fost reprodus în condiții de fabricare în serie la întreprinderea „FICOTEHFARM” SRL (or. Chișinău, R. Moldova). Principalele rezultate ale testării tehnologiei în serie semiindustrială sunt redată în tab. 4.5 - 4.8.

Conform datelor obținute, tehnologia elaborată poate fi introdusă în fabricarea în serie a produselor (preparatelor și suplimentelor germaniucumponente) în baza biomasei de spirulină. Toate etapele – cheie ale procesului de fabricare în condiții de serie se încadrează în limitele de referință (tehnologia elaborată în condiții de cercetare în laborator). Toți parametrii de control interfazic și final de proces, precum și cei de calitate monitorizați în cadrul secvențelor tehnologice: *Fabricarea biomasei de spirulină cu conținut sporit de germaniu (Spirulina germaniucumponică)*; *Producerea extractului de aminoacizi liberi și oligopeptide germaniucumponente (BioR-Germanium)*; *Producerea extractului proteic germaniucumponent (Supliment Ge-proteic)* s-au încadrat în limitele prescripției de referință și nu au deviat de la aceasta.

Prin urmare, fluxul tehnologic de obținere în baza biomasei de spirulină a produselor germaniucumponente elaborat nu prezintă modificări majore ale elementelor și etapelor tehnologice cruciale, rezultatele se încadrează în limitele specifice, iar fabricarea lor în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Tabelul 4.5. Parametrii de control interfazic și finit în procesul de producere în serie a biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu
(Biomasa germaniuorganică)

Lotul fabricat	Durata ciclului de cultivare, ore	Interval monitorizare proces cultivare, ore	Parametrii supuși monitorizării					
			Cantitatea de inoculum, g/l substanță uscată	Temperatura, °C	Iluminarea, μM fotoni/m ² /s	pH-ul, unit. de pH	Nivelul creșterii culturii, g/l	Biomasa produsă, g
002 (FTF-Ge BSp)	144	48	0,430	28	37	8,5	0,70	95,0
		96		30	55	9,5	0,85	
		144		30	55	10,5	0,99	
Conform specificației elaborate	144	-	0,4-0,45	28-30	37-55	8,5-10,5	-	95,0-100,00g

Tabelul 4.6. Parametrii de control calitate a biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu
la producerea în serie (Biomasa germaniuorganică)

Lotul	Parametri fizico-chimici:		Parametri calitate, g/100g biomasă						
	Aspect extern	Concentrația, mg/ml	Aminoacizi, g/100g biomasă	Oligopeptide, g/100g biomasă	Proteine, g/100g biomasă	Glucide, g/100g biomasă	Lipide, g/100g biomasă	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS	Germaniu, g/100g biomasă
002 (FTF-Ge BSp)	Masă de culoare verde închisă cu nuanță albastră cu miros specific	100,0	3,6±0,11	6,90±0,15	62,25±2,84	15,95±0,44	8,25±0,23	68,0±1,40	0,09±0,0015
Condiții de admisibilitate (Conform specificației elaborate)	Masă (pastă) densă de culoare verde intensă, și/sau verde închisă și/sau verde închisă cu nuanță albastră cu miros caracteristic	100-105	3,0-4,0	6,5-7,0	60,0-65,00	15,50-16,50	7,50-8,50	65,0-70,0	0,085-0,095

Tabelul 4.7. Parametrii de control interfazic și finit în procesul de fabricare a extractului de aminoacizi și oligopeptide germaniucum componente
(BioR-Germanium)

Lotul fabricat	Parametrii fizico-chimici			Compoziție			
	Forma	Miros	Colorație	Identificare (Aminoacizi și oligopeptide)	Dozare		
					Aminoacizi și oligopeptide, mg/ml Cel puțin	Germaniu, μg/ml	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS
001- (FTF – ES - AAP/Ge)	Corespunde	Corespunde	Corespunde	Col.albastru-violetă	0,435	1,55	65,0
Conform componentelor prescripției/ condiții de admisibilitate	Soluție alcoolică de 50%	Specific extractului de aminoacizi și oligopeptide din spirulină	Verde cu nuanță cafenie sau cafenie cu nuanță verde, sau cafenie cu nuanță galbenă	Reacția calitativă cu soluție de ninhidrină. Apare col albastru-violetă	0,40	1,0-1,5	60,5-70,5

Tabelul 4.8. Parametrii de control interfazic și finit în procesul de fabricare a suplimentului proteic germaniuc organic
(Supliment Ge-proteic)

Lotul fabricat	Parametrii fizico-chimici			Compoziție		
	Forma	Miros	Colorație	Proteine, Cel puțin, mg/ml	Germaniu, μg/ml	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS
001- (FTF – ES - P/Ge)	Corespunde	Corespunde	Corespunde	6,5	2,4	65,55
Conform componentelor prescripției/ condiții de admisibilitate	Lichid dens	Specific extractului proteic din spirulină	Verde cu nuanță cafenie sau cafenie cu nuanță verde, sau cafenie cu nuanță galbenă	5,70-6,70	2,0-2,5	65,5-70,5

4.3.2 Variante tehnologice de obținere a biomasei de spirulină, îmbogățite cu germaniu și seleniu (sau seleniu și germaniu) - materie primă biologic activă pentru fabricarea preparatelor policomponente ce conțin ambele microelemente

Rezultatele cercetărilor redată în această lucrare au scos în evidență compusul anorganic GeSe_2 . S-a demonstrat, că spirulina acumulează eficient atât seleniul (p. 3.1.1, cap. 3), cât și germaniul (p. 4.1.1, cap. 4) din acest compus.

Vom menționa, că condițiile și parametrii de proces care pot asigura acumularea maximală a fiecăruia din aceste oligoelemente în biomasa de spirulină sunt specifice și prezintă anumite deosebiri. Iată de ce partea tehnologică care implică utilizarea selenurii de germaniu în calitate de unul dintre factorii-cheie de proces a fost dezvoltată pe două căi aparte:

Prima cale urmată a fost cea pe durata căreia s-au respectat parametrii și *elaborate unele dintre condițiile* care asigură obținerea biomasei de spirulină cu un conținut sporit de seleniu: cantitatea redusă de bicarbonat și sulfat în mediul nutritiv, menținerea pH-ului la valoarea de 8,0 - 8,5, *suplimentarea compusului în concentrație de 30 mg/l la a treia zi de cultivare*;

Pe cea de a doua cale a fost dezvoltată tehnologia care asigură obținerea biomasei cu conținut sporit de germaniu: mediul nutritiv modificat Zarrouk, *suplimentarea selenurii de germaniu în concentrație de 15 mg/l în prima zi și cultivarea spirulinei la temperatura 28 °C, iluminarea de 37 μM fotoni/ m^2/s ; pH-ul = 8,5 timp de 48 ore, suplimentarea a încă 15 mg/l compus și continuarea cultivării spirulinei la temperatura 30 °C, iluminarea de 55 μM fotoni/ m^2/s ; pH-ul = 9,0 - 10,5.*

Chiar dacă tehnologiile au fost elaborate ținând cont de condițiile specifice de obținere a uneia sau a alteia biomase, nu poate fi neglijat faptul că în cazul biomasei cu conținut sporit de seleniu aceasta conține într-o cantitate mai mare și germaniul, iar în cazul biomasei cu conținut sporit de germaniu aceasta conține într-o cantitate apreciabilă și seleniul. A fost determinată cantitatea germaniului în biomasa produsă în condițiile de obținere a biomasei cu conținut sporit de seleniu și invers – cantitatea de seleniu în biomasa cu conținut sporit de germaniu. Astfel, biomasa de spirulină cu conținut sporit de seleniu conține și circa 76 mg% germaniu, iar biomasa cu conținut sporit de germaniu conține și circa 235 mg% seleniu, ceea ce permite ca de rând cu cele două tehnologii elaborate să fie propuse și variantele tehnologice de obținere a materiei prime și a preparatelor și suplimentelor ce conțin ambele oligoelemente (seleniul și germaniul) sau (germaniul și seleniul) cu etapele principale de producere în serie redată în figura 4.11. Prin urmare, aplicarea *selenurii de germaniu* la cultivarea spirulinei este foarte atractivă din punct de vedere tehnologic, oferind oportunitatea unor variante de obținere:

- (1) a biomasei (conform procedurii descrise în p. 3.2, cap. 3) și preparatelor ce conțin *seleniu dar și germaniu* (conform tehnologiei descrise în p. 3.3, cap. 3);
- (2) a biomasei (conform procedurii descrise în p. 4.2, cap. 4) și preparatelor ce conțin *germaniu dar și seleniu* (conform tehnologiei descrise în p. 4.3, cap. 4).

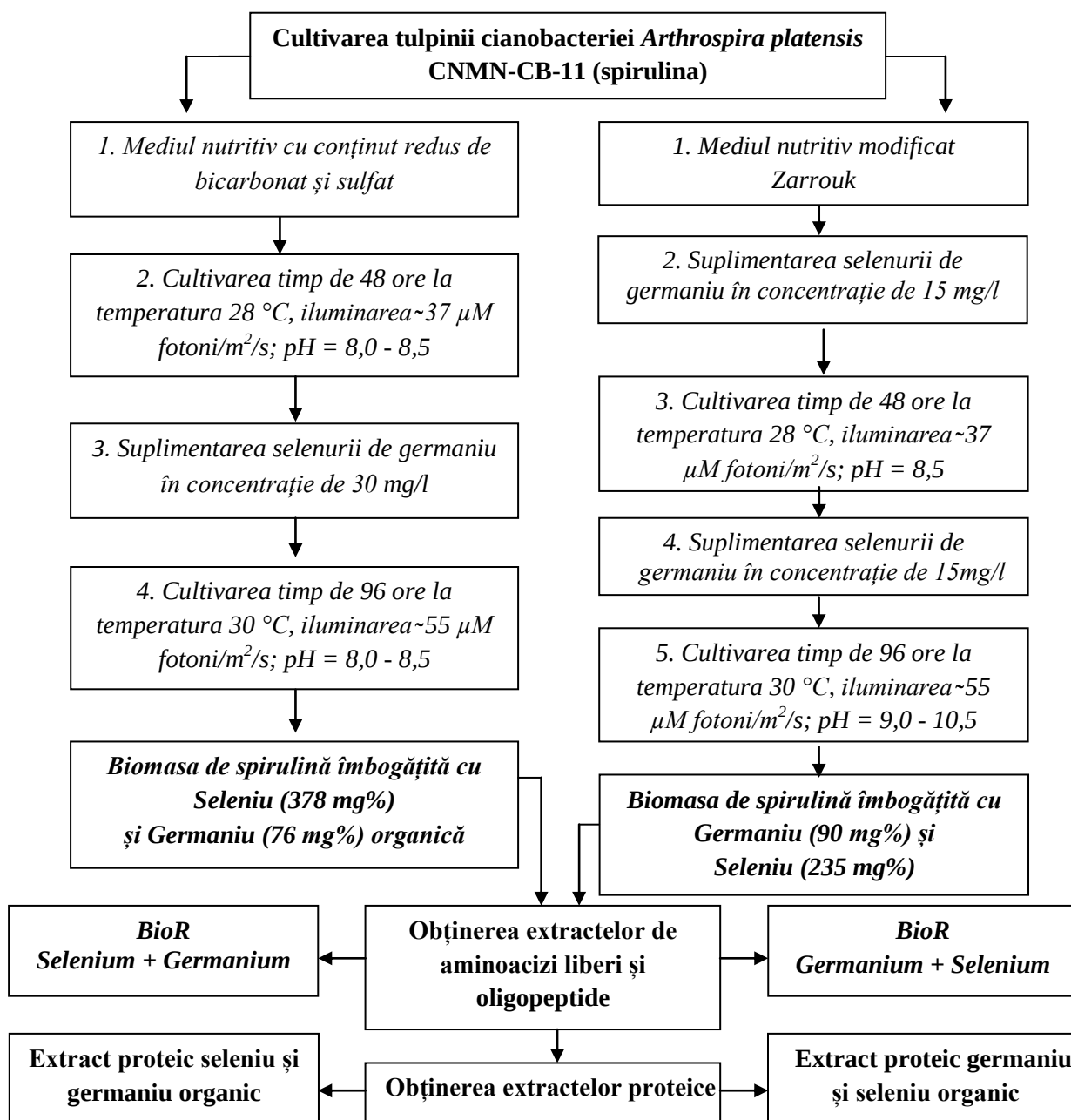


Fig. 4.11. Etapele tehnologice principale de obținere a biomasei de spirulină, îmbogățite cu germaniu și seleniu (sau seleniu și germaniu)

Biomasa de spirulină ce conține ambele microelemente, de asemenea, poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor policomponente cu proprietăți antioxidante, imunomodulatoare și anticancer.

4.4 Concluzii la capitolul 4

1. Compușii anorganici și organici ai Ge (IV), testați în concentrațiile de 10, 20 și 30 mg/l modifică mai pronunțat sau mai atenuat, în direcția scăderii, nivelurile de producere a biomasei de spirulină, cu excepția selenurii de germaniu care sporește aceste niveluri cu până la 25,36% [74, 305].
2. Compușii anorganici și organici ai Ge (IV), în concentrațiile aplicate favorizează acumularea germaniului în biomasa spirulinei. Selenura de germaniu în concentrația de 30 mg/l determină acumularea maximală a germaniului în biomasa de spirulină - 75,7 mg%. După efectul exercitat asupra nivelului de acumulare a germaniului (mg%) în biomasă, compușii organici pot fi clasati în șirul: FM-2 (8,65) < FM-9 (12,81) < FM-10 (15,84) < FM-3(18,07) < FM-8 (23,85) < FM-1 (25,34) < FM-11 (29,07) [74, 305].
3. Compușii anorganici și organici ai Ge (IV) în anumite concentrații stimulează sinteza unor compuși biologic activi la cianobacteria *A. platensis*. Compusul $Mes_2Ge(F)$ -PHMes (10 mg/l) a sporit sinteza proteinelor cu 20,7%; dioxidul de germaniu (30 mg/l) a stimulat cu 33% conținutul de ficobiliproteine, cu 35,9% conținutul de lipide și cu 84,3% conținutul de glucide. Selenura de germaniu (30 mg/l) a contribuit la sporirea cu 87% a conținutului de lipide și cu 50,3 % a conținutului de glucide în biomasă [74, 306].
4. Procedul de cultivare a tulpinii cianobacteriei *A. platensis* CNMN-CB-11 în condițiile și la parametrii optimali de acumulare a germaniului: mediul modificat Zarrouk, iluminarea de 37~55 μM fotoni/ m^2/s ; pH-ul = 9,0 - 10,5, temperatura de 28 - 30 °C, iar sursa de germaniu ($GeSe_2$), adaugată în rate (în 1-a și în a 3-a zi de cultivare) asigură obținerea unei biomase cu un conținut sporit de germaniu - 90,5 mg% (dintre care 66 mg% reprezintă germaniul bioconvertit), seleniu (235 mg%) și alte substanțe bioactive.
5. A fost elaborată tehnologia care asigură obținerea biomasei de spirulină cu un conținut sporit de germaniu și în baza acesteia a produsului „*Spirulina germaniorganică*”, a preparatului „*BioR-Germanium*” și a „*Suplimentului Ge-proteic*” în cadrul unui singur ciclu tehnologic.
6. Selenura de germaniu oferă oportunitatea executării unor variante tehnologice de obținere în cadrul unui singur flux tehnologic a unor preparate și suplimente ce conțin atât seleniu, cât și germaniu (sau atât germaniu, cât și seleniu), ca parte componentă efectivă.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Rezultatele obținute în raport cu scopul și obiectivele formulate în cadrul tezei de doctorat „**Biotehnologii de obținere a preparatelor cu conținut sporit de seleniu și germaniu în baza biomasei de spirulină**”, au condus la formularea următoarelor concluzii generale:

1. Tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 acumulează în procesul de creștere seleniul și/sau germaniul din compușii chimici ai acestor oligoelemente, procesul fiind unul doză-dependent, iar eficiența maximală este atinsă în prezența surselor anorganice a acestor elemente: selenitul de fier hexahidrat (50 mg/l: seleniu) și selenura de germaniu (30 mg/l: germaniu și/sau seleniu) [17, 58, 305] (cap. 3, cap. 4).
2. În dependență de compus și concentrație, procesul de acumulare a biomasei este influențat în trei maniere diferite: Na_2SeO_3 , $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și GeSe_2 stimulează producerea de biomasă de către spirulina. Compușii organici FM-3, FM-8, FM-9 și FM-11 produc efecte de scădere sau nu influențează acest proces, iar dioxidul de germaniu și compușii organici ai Ge (IV) FM-1, FM-2 și FM-10 sunt toxici pentru cultura de spirulină [17, 305] (cap. 3, cap. 4).
3. Acumularea seleniului și/sau germaniului în biomasa de spirulină nu afectează calitatea (compoziția biochimică) și nivelul de siguranță al acesteia (conform datelor testului ABTS și DAM). Au fost evidențiate, de asemenea, efecte benefice a unor compuși anorganici ai Se (IV) și Ge (IV), și a unor compuși organici Ge (IV), care în anumite concentrații, au stimulat sinteza unor componente ale biomasei, și pot fi utilizați pentru obținerea unei biomase cu cantități maximal prognozate de substanțe biologic active la spirulina [4 - 5, 74, 306] (cap. 3, cap. 4).
4. Procedeele elaborate cu utilizarea selenurii de germaniu în concentrație de 30 mg/l în a 3-a zi și a selenitului de fier hexahidrat în concentrație de 50 mg/l suplimentat în rate: $\frac{1}{2}$ în 1-a zi de cultivare și $\frac{1}{2}$ în a 3-a zi de cultivare a spirulinei, asigură obținerea unei biomase cu un conținut sporit de seleniu (378 - 690 mg%). Din conținutul total, 71,6 - 74,8% reprezintă seleniul încorporat de către bioliganzii intracelulari ai spirulinei: aminoacizii liberi și oligopeptidele (23,8 - 26,8%), proteinele (27,2 - 28,5%), lipidele (10,5 - 12,8%) și glucidele (8 - 9%) (cap. 3).
5. Procedeele de cultivare a spirulinei în condițiile optimele și cu adăugarea selenurii de germaniu în concentrație de 15 mg/l în 1-a zi și de 15 mg/l în a 3-a zi de cultivare, asigură acumularea maximală a germaniului în biomasă (90,5 mg%). Germaniul

- biotransformat constituie circa 73,72% și este integrat în fracțiile aminoacizilor liberi și oligopeptidelor (24,1), proteinelor (27,8), lipidelor (12,6) și glucidelor (9,2%) (cap. 4).
6. Au fost elaborate tehnologiile care redau schemele de obținere în cadrul unui singur flux de fabricare, a 9 variante de noi preparate ce conțin ca parte componentă activă seleniul și/sau germaniul biotransformate. Tehnologiile valorifică materii prime și materiale non toxice „prietenoase mediului” și prezintă oportunități de producere în condiții controlate (cap. 3, cap. 4).
 7. Utilizarea selenurii de germaniu la cultivarea tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, oferă oportunitatea producerii în serie a materiei prime biologic active ce conține în cantități importante ambele microelemente – sursă de preparate policomponente cu efecte sinergice antioxidante, imunomodulatoare, anticancer (cap. 4).

Aportul personal. Toate rezultatele obținute și expuse în cadrul tezei de doctorat, analiza, generalizările și concluziile aparțin autoarei. În materialele care reflectă conținutul brevetelor de invenție MD 228 și MD 4123 (Anexa 1) autoarei îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor.

Rezultatul obținut care a contribuit la soluționarea unei probleme științifice importante puse în fața acestei lucrări constă în fundamentarea științifică a capacității tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 de a acumula și biotransforma seleniul și germaniul din compuși chimici, ceea ce a condus la elaborarea unor procedee noi de obținere a biomasei de spirulină îmbogățite cu seleniu și/sau germaniu, fapt ce a permis obținerea din această biomasă, în cadrul unui singur flux tehnologic, a preparatelor noi cu conținut sporit de aceste microelemente de importanță biologică.

În aspect teoretic, au fost acumulate date noi despre caracterul acțiunii unor compuși chimici ai Se (IV) și Ge (IV) asupra producerii de biomasă de către tulpina cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11, precum și despre nivelul și condițiile de acumulare a seleniului și germaniului de către această tulpină. Au fost elucidate modificările în compoziția biochimică, conținutul produselor degradării oxidative a lipidelor și în nivelul activității antioxidante a biomasei pe parcursul procesului de acumulare a seleniului și germaniului de către spirulina.

În aspect aplicativ, au fost elaborate 3 procedee de obținere a biomasei de spirulină îmbogățită cu seleniu și/sau germaniu; Au fost elaborate schemele tehnologice de obținere în cadrul unui singur flux de fabricare, a 9 variante de preparate noi cu conținut sporit de seleniu

și/sau germaniu. Selenura de germaniu oferă oportunitatea obținerii în baza biomasei de spirulină a materiilor prime biologic active ce conțin în cantități sporite ambele microelemente.

Materialele obținute la tema tezei au fost expuse la următoarele foruri științifice naționale și internaționale:

Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”, USM, 10-11 noiembrie, 2020, Chișinău, R. Moldova; Al V-lea Simpozion științific național cu participare internațională „Biotehnologii avansate-realizări și perspective”, 21-22 octombrie, 2019, Chișinău, R. Moldova; The Xth International Congress of Geneticists and Breeders. 28 June - 1 July 2015, Chișinău, R. Moldova; IX Международная научная конференция посвященная 50-летию создания Института Микробиологии НАН Беларуси. 7-11 сентября 2015, Минск, Р. Беларусь; V th International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”, November 3-5, 2014, Chișinău, R. Moldova; International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition), October 9-10, 2014, Chișinău, R. Moldova; Al III-lea Simpozion național cu participare internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, 24-25 octombrie, 2013, Chișinău, R. Moldova; Международная научно практическая конференция молодых ученых „PONTUS EUXINUS”, по проблемам водных экосистем, посвященной 50 летию образования Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины. 1–4 октября 2013, Севастополь, Украина.

Rezultatele științifice obținute în lucrare sunt reflectate în 2 capitole în monografii internaționale; 2 articole în monoautorat în revistă din străinătate recunoscută și 7 articole în reviste recenzate, categoria B și C (2 în monoautorat); 2 articole și 7 rezumate ale comunicărilor științifice la conferințe naționale și internaționale; 2 brevete de invenție.

Rezultatele științifice au fost implementate la uzina FICOTEHFARM SRL, or. Chișinău, R. Moldova (Anexa 2: Acte de implementare Nr. 01-11/2017 și Nr. 02-11/2017 din 30.11.2017) (Anexa 2).

Tehnologiile și produsele elaborate pe baza rezultatelor obținute la tema lucrării au fost expuse și apreciate cu 7 medalii de aur și 1 de argint, Diploma Ministerului Educației Naționale a României la: *Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT*, Ediția a XIII-a, 2013, Chișinău, R. Moldova; *European Exhibition of Creativity and Innovation EUROINVENT*, 22-24 May 2014, Iași, România; al 16-lea Salon de Inventică și Inovații INVENTICA 2014, 15-18 octombrie, București, România; *International Exposition for Inventions INOVA*, 6-8 November 2014, Osijek, Croatia; *European Exhibition of Creativity and Innovation ”EUROINVENT”*, May 14-16, 2015, Iasi, Romania; *The XIX-th International Exhibition of Research, Innovation and Technological Transfer ”INVENTICA”*, June 24-26, 2015, Iasi, Romania; *40th International*

Invention Show, 11th Invention and prototype show and student Bussines plan competition, November 05-07, 2015, Karlovac, Croatia; New International Warsaw Invention Show IWIS 2016, 10-12 october 2016, Warsaw, Poland (Anexa 3).

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă utilizarea tulpinii cianobacteriei *Arthrospira platensis* CNMN-CB-11 în calitate de matrice pentru biotransformarea seleniului și/sau germaniului în condiții de fabricare în serie;
2. Se recomandă utilizarea biomasei selenorganice și/sau germaniuorganice obținute la cultivarea în condiții controlate a spirulinei pentru fabricarea materiilor prime biologic active destinate fabricării preparatelor policomponente ce conțin seleniu și/sau germaniu biotransformat.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Cercetarea, dar și partea tehnologică în special, asupra selenurii de germaniu, compusul care a demonstrat o eficacitate și o perspectivă de aplicare a lui în calitate de sursă de germaniu și seleniu poate fi continuată cu detalizarea unor mecanisme a lui de acumulare și de biotransformare a acestor microelemente în celulele altor tulpini de microalge și cianobacterii de interes tehnologic.
2. Este oportună dezvoltarea în continuare a direcției de cercetare științifico-practică, destinate precăutării noilor tulpini de microorganisme cu capacitate de acumulare și biotransformare eficientă a microelementelor, în vederea diversificării spectrului de materii prime biologic active pentru fabricarea preparatelor policomponente naturale.

BIBLIOGRAFIE:

În limba română

1. BULIMAGA, V., **DJUR, S.**, PISOV, M., RUDIC, V., RUDI, L. Capacitatea antioxidantă a preparatelor de ficocianină obținute în baza biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu. În: *Studia Universitatis USM: Științe ale naturii*. 2012, nr. 1(51), p. 9-13. ISSN 1814-3237.
2. CEPOI, L. Particularitățile manifestării stresului oxidativ indus de cupru (II) la *Spirulina platensis*. În: *Akademios, Științe biologice*. 2017, vol. 4(47), pp. 39-44. ISSN 1857-0461.
3. CHIRIAC, T. Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozat de zinc și principii bioactive valoroase. *tz. de doct. în șt. biologice*. Chișinău, 2003. 140 p.
4. **DJUR, S.** Modificarea activității antioxidante în procesul de acumulare a seleniului în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei: Științele vieții*. 2018, nr. 1(334), p.150-156. ISSN 1857-064X.
5. **DJUR, S.** Modificarea compoziției biochimice a spirulinei ca răspuns la acumularea seleniului în biomasă. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei: Științele vieții*. 2019, nr. 3(339), p. 116-124. ISSN 1857-064X.
6. **DJUR, S.**, BULIMAGA, V., ZOSIM, L., TASCA, I., DUMBRĂVEANU, V. Procedeu de obținere a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* cu conținut sporit de germaniu și seleniu. În: *Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”*. Rezumatele comunicărilor, USM, 10-11 noiembrie, 2020, Chișinău, Republica Moldova, pp. 94-97. ISBN 978-9975-152-48-8.
7. GULEA, Aurelian, ESCUDIE, Jean, BULIMAGA, Valentina, RUDIC, Valeriu, ZOSIM, Liliana, **DJUR, Svetlana**. *Procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis*. Brevet de invenție MD 228, C12N 1/12, C12N 1/38, C12Q 1/02, C01G 17/04, C07F 7/30. Universitatea de Stat din Moldova. Nr. depozit S2010 0021. Data depozit 28.01.2010. Publicat 28.02.2011. În: BOPI. 2010, nr. 6, p. 39.
8. HOTĂRÂRE Nr. 538 din 02.09.2009 pentru aprobarea Regulamentului sanitar privind suplimentele alimentare. Publicat: 08.09.2009. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, Nr. 138-139 art. 603. Versiune în vigoare din 20.12.17 în baza modificărilor prin HG1090 din 18.12.17, MO440/20.12.17 art.1214.
9. LOSEVA, L., ANUFRIC, S., CHIRIAC, T., CEPOI, L., **DJUR, S.**, GHELBET, V., RUDIC, V. Efectul biologic al selenitului de sodiu asupra creșterii *Spirulina platensis* și dinamica acumulării seleniului în biomasă. În: *Al III-lea Simpozion național cu participare*

- internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, 24-25 octombrie, 2013, Chișinău, Republica Moldova, Teze/com. șt., p. 51. ISBN 978-9975-56-111-2.
10. RUDIC, V. *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne*. Chișinău: Știința, 1993. 140 p.
 11. RUDIC, V. *BioR. Studii biomedicale și clinice*. Chișinău: S.n., Elena - V.I., 2007, 376 p. ISBN 978-9975-9548-8-4.
 12. RUDIC, V. ș. a. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: Elena - V.I., 2007, 365p. ISBN 978-9975-9892-5-1.
 13. RUDIC, V. ș. a. Relevanța testului TBARS în determinarea stresului oxidativ la *Spirulina platensis* pe durata ciclului de cultivare. În: *Buletinul Academiei de Științe. Științele Vieții*. 2016, vol. 3(330), pp. 143-149. ISSN 1857-064X.
 14. RUDIC, V., BULIMAGA, V., **DJUR, S.** Elaborarea tehnologiei de obținere a preparatelor cu conținut de germaniu în baza biomasei de spirulină. În: *Revista de proprietate intelectuală „Intellectus”*. 2012, nr. 2, p. 98-101. ISSN 1810-7079.
 15. RUDIC, V., CHIRIAC, T., RUDI, L., CEPOI, L., ROTARI, I., **DJUR (MAXACOVA), S.** *Spirulina (Arthrospira) platensis* – sursă de nutraceutice. În: *Al V-lea Simpozionul științific național cu participare internațională "Biotehnologii avansate - realizări și perspective"*, 21-22 octombrie, 2019, Chișinău, Republica Moldova, Teze/com. șt., p. 57. ISBN 978-9975-56-695-7.
 16. RUDIC, V., **DJUR, S.**, CEPOI, L., CHIRIAC, T., RUDI, L., CODREANU, S., GHELBET, V. Noi premixuri furajere în baza biomasei de spirulină cu selen. În: *V International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”*, November 3-5, 2014, Chișinău, Republica Moldova, pp. 82-88. ISBN 978-9975-71-577-5.
 17. RUDIC, V., **DJUR S.**, CEPOI, L., CHIRIAC, T., RUDI, L., ȘOVA, S. Cianobacteria *Spirulina platensis* – matrice pentru producerea compușilor organici selenocompauzi. În: *Academos*. 2014, nr. 1(32), p. 83-88. ISSN 1857-0461.
 18. RUDIC, V., GUDUMAC, V., GULEA, A. *Metoda de determinare a biomasei absolut uscate de spirulină*. Brevet de invenție, nr. 1078/92.08.788(RO). În: *Buletinul de Invenții și Mărci*, nr.6, 1993, România.
 19. RUDIC, Valeriu. *Tulpină de algă Spirulina platensis (Nordst) Geitl în calitate de sursă de substanțe biologice active*. Brevet de invenție MD 4122 C1 2012.02.29. RUDIC Valeriu, MD. Nr. depozit: A2011 0016 Data depozit 2011.02.24. Publicat 2011.07.31. În: *BOPI*. 2011, nr. 7, p. 21.
 20. ȘOVA, Sergiu, RUDIC, Valeriu, BULIMAGA, Valentina, **DJUR, Svetlana**. *Procedeu de obținere a selenitului de fier $Fe_2Se_3O_9 \cdot 6H_2O$ și procedeu de cultivare a cianobacteriei*

Spirulina platensis cu utilizarea acestuia. Brevet de invenție MD 4123, C12N 1/12, C12N 1/38, C12R 1/89, C01B 19/00, C01G 49/00. ȘOVA Sergiu, MD; RUDIC Valeriu, MD. Nr. depozit A2011 0028. Data depozit 24.03.2011. Publicat 29.02.2012. În: BOPI. 2011, nr. 7, pp. 21-23.

21. VRABIE, V. ș. a. Corelarea activității antiradicalice a mierii cu conținutul aminoacizilor liberi. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2018, nr. 3(336), pp. 35-45. ISSN 1857-064X.

În limba engleză

22. ADADI, P. et. al. Designing selenium functional foods and beverages: A review. In: *Food Research International*. 2019, 120, pp. 708-725. ISSN: 0963-9969.
23. AKALIN, A.S., UNAL, G., DALAY, M.C. Influence of *Spirulina platensis* biomass on microbiological viability in traditional and probiotic yogurts during refrigerated storage. In: *Italian Journal of Food Science*. 2009, vol. 21, pp. 357-364. ISSN: 1120-1770.
24. ALAM, A. et al. Efficacy of spirulina (Tahlab) in patients of type 2 diabetes mellitus (Ziabetus Shakri) - A randomized controlled trial. In: *Journal of Diabetes & Metabolism*. 2016, vol. 7(10), 710. ISSN 2155-6156.
25. ALDOSARY, B.M. et al. Case series of selenium toxicity from a nutritional supplement. In: *Clinical Toxicology (Philadelphia)*. 2012, vol. 50(1), pp. 57-64. ISSN (online) 1556-9519.
26. ALFTHAN, G. et al. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. In: *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015, vol. 31, pp. 142-147. ISSN (online) 1878-3252.
27. ALI, S., SALEH, A. Spirulina: an overview. In: *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012, vol. 4, pp. 9-15. ISSN (online) 0975-1491.
28. AMANKWAH, N., HAN, Z. Cardiomyopathy secondary to selenium deficiency: A review of clinical cases. In: *The Open Nutrition Journal*. 2018, vol. 12(1), pp. 74-88. ISSN (online) 1874-2882.
29. ARAIE, H., SHIRAIWA, Y. Selenium in Algae. In: BOROWITZKA, M., BEARDALL, J., RAVEN, J. eds. *The Physiology of Microalgae* Cham Switzerland: Springer International Publishing, 2016, vol. 6(1), pp. 281-288. ISBN 978-3-319-24945-2.
30. ARIKAN, D. C. et al. Plasma selenium, zinc, copper and lipid levels in postmenopausal Turkish women and their relation with osteoporosis. In: *Biological Trace Element Research*. 2011, vol. 144(1-3), pp. 407-417. ISSN 1559-0720.

31. ASAI, K. *Miracle Cure: Organic Germanium*. Tokyo: Japan Publications Inc., 1980. 171 p. ISBN 978-0870-40-474-0.
32. ASGHARI, A. et al. A Review on antioxidant properties of Spirulina. In: *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2016, vol. 3(1), pp. 345-351. ISSN 2322-1186.
33. AYE HUNIE, S. et al. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). In: *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1998, vol. 18(1), pp. 7-12. ISSN (online) 0894-9255.
34. AZAM, F. Silicic-acid uptake in diatoms studied with [⁶⁸Ge] germanic acid as tracer. In: *Planta*. 1974, vol. 121, pp. 205-212. ISSN (online) 1432-2048.
35. AZAM, F., VOLCANI, B. Germanium-silicon interactions in biological systems. In: SIMPSON, T., VOLCANI, B. (Eds.) *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*. Springer, New York. 1981, pp. 43-67. ISBN (Online) 978-1-4612-5944-2.
36. BABATOLA, S. S. Global burden of diseases attributable to air pollution. In: *Journal of Public Health in Africa*. 2018, vol. 9(3), 813. ISSN (online) 2038-9930.
37. BAIANO, A., DEL NOBILE, M. Antioxidant compounds from vegetable matrices: biosynthesis, occurrence, and extraction systems. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016, vol. 56(12), pp. 2053-2068. ISSN (online) 1549-7852.
38. BARKIA, I., SAARI, N., MANNING, S. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. In: *Marine Drugs*. 2019, vol. 17(5), 304. ISSN 1660-3397.
39. BECZE, A. et al. Study regarding the influence of the salinity stress on the antioxidant capacity of *Arthrospira platensis*. In: *Agricultura*. 2017, nr. 3-4(103), pp. 12-16. ISSN 1221-5317.
40. BEHESHTIPOUR, H. et al. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013, vol. 12, pp. 144-154. ISSN (online) 1541-4337.
41. BELAY, A. Biology and industrial production of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: RICHMOND, A., QIANG, H. eds. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Wiley, Hoboken, 2013, Second Edition, pp. 339-358. ISBN 978-0-470-67389-8.
42. BERTRAND, M., POIRIER, I. Photosynthetic organisms and excess of metals. In: *Photosynthetica*. 2005, vol. 43(3), pp. 345-353. ISSN 0300-3604.
43. BHAKAR, R., KUMAR, R., PABBI, S. Total lipids and fatty acid profile of different *Spirulina* strains as affected by salinity and incubation time. In: *International journal of plant research*. 2013, vol. 26(special), pp. 148-154. ISSN (online) 2163-260X.

44. BIERLA, K. et al. A comparative study of the Se/S substitution in methionine and cysteine in Se-enriched yeast using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS)-assisted proteomics approach. In: *Journal of Proteomics*. 2013, vol. 87, pp. 26-39. ISSN 1874-3919.
45. BILAL, M. et al. High-value compounds from microalgae with industrial exploitability - A review. In: *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2017, vol. 9, pp. 319-342. ISSN (online) 1945-0524.
46. BJELICA, J. et. al. Effects of selenium and thyroid hormone deficiency on peritoneal macrophages adhesion and occurrence of natural IgM antibodies in juvenile rats. In: *Acta Veterinaria*. 2017, vol. 67(3), pp. 340-355. ISSN (online) 1820-7448.
47. BLIGH, E., DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. In: *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959, vol. 37(8), pp. 911-917. ISSN 0576-5544.
48. BODNAR, M. et al. The properties, functions, and use of selenium compounds in living organisms. In: *Journal of Environmental Science and Health*. 2012, vol. 30(3), pp. 225-252. ISSN (online) 2689-6591.
49. BRAAKHUIS, A., HOPKINS, W. Impact of dietary antioxidants on sport performance: A review. In: *Sports Medicine*. 2015, vol. 45(7), pp. 939-955. ISSN (online) 2198-9761.
50. BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; FLOHÉ, L. Selenium and redox signaling. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2017, 617, pp. 48-59. ISSN 1096-0384.
51. BULTEAU, A., CHAVATTE, L. Update on selenoprotein biosynthesis. In: *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015, vol. 23(10), pp. 775-94. ISSN (online) 1557-7716.
52. BURK, R., HILL, K. Regulation of selenium metabolism and transport (Review) In: *Annual Review of Nutrition*. 2015, vol. 35(1), pp. 109-134. ISSN (online) 0199-9885.
53. CAPORGNO, M., MATHYS, A. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. In: *Frontiers in Nutrition*. 2018, vol. 5, pp. 1-10. ISSN (online) 2296-861X.
54. CEPOI, L. et al. Malondialdehyde - a potential marker of nanoparticle toxicity in an aquatic environment. In: *One Health & Risk Management*. 2020, vol. 1(1), pp. 64-71. ISSN (online) 2587-3466.
55. CEPOI, L. et al. *Spirulina platensis* as renewable accumulator for heavy metals accumulation from multi-element synthetic effluents. In: *Environmental Science and Pollution Research International*. 2020, vol. 27(25), pp. 31793-31811. ISSN: 1614-7499.

56. CEPOI, L., CHIRIAC, T., RUDI, L., **DJUR, S.**, ZOSIM, L., BULIMAGA, V., BATIR, L., ELENCIUC, D., RUDIC, V. Spirulina as raw material for product containing trace elements. In: CHOJNACKA K.; SAIED A., eds. *Recent Advances in Trace Elements*. Oxford: John Wiley and Sons Ltd, 2018, First Edition, pp. 403-420. ISBN:9781119133780.
57. CEPOI, L., CHIRIAC, T., **DJUR, S.**, LOSEVA, L., CUCER, A., RUDIC, V. New feed additives with organic selenium. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition)*, October 9-10, 2014, Chişinău, Republica Moldova, p. 111. ISBN 978-9975-4432-8-9.
58. CEPOI, L., ZINICOVSCAIA, I., ZOSIM, L., CHIRIAC, T., RUDIC, V., RUDI, L., **DJUR, S.**, ELENCIUC, D., MISCU, V., BATÎR, L., GULEA, A., BULIMAGA, V. Metals removal by cyanobacteria and accumulation in biomass. In: ZINICOVSCAIA, I., CEPOI, L. eds. *Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters*. Cham: Springer International Publishing. 2016, pp. 61-111. ISBN 978-3-319-26751-7.
59. CHABROL, B., CHARONNAT, R. Une nouvelle reaction pour l'étude des lipides: L'oleidemie. In: *La Presse Médicale*. 1937, vol. 45, pp. 1713-1714. ISSN 0755-4982.
60. CHAUDHARY, A., SINGH, A., RAWAT, E. Synthesis, characterization and biological activity of monometallic complexes of germanium. In: *International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*. 2016, vol. 3(12), pp. 35-43. ISSN (online) 2348-5221.
61. CHAUHAN, R. et al. Understanding selenium metabolism in plants and its role as a beneficial element. In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2019, vol. 49(21), pp. 1937-1958. ISSN (online) 1547-6537.
62. CHEN, J. An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). In: *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2012, vol. 21(3), pp. 320-326. ISSN (online) 1440-6047.
63. CHIAPPINO, M., AZAM, F., VOLCANI, B. Effects of germanic acid on developing cell walls of diatoms. In: *Protoplasma*. 1977, vol. 93, pp. 191-204. ISSN (online) 1615-6102.
64. CHIRASUWAN, N., et al. Anti HSV-1 activity of *Spirulina platensis* polysaccharide. In: *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 2008, vol. 41, pp. 311-318. ISSN 0075-5192.
65. CHO, J. et al. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. In: *PLoS ONE*. 2020, vol. 15(10): e0240358. ISSN (online) 1932-6203.
66. CHU, W., PHANG, S. Bioactive compounds from microalgae and their potential applications as pharmaceuticals and nutraceuticals. In: HALLMANN, A., RAMPELOTTO,

- P. (eds) *Grand Challenges in Algae Biotechnology*. 2019, pp 429-469, Springer, Cham. ISBN (online) 978-3-030-25233-5.
67. CUBADDA, F. et al. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, vol. 58(4), pp. 2295-2301. ISSN (online) 1520-5118.
 68. CUPP-SUTTON, K., ASHBY, M. Biological chemistry of hydrogen selenide. In: *Antioxidants (Basel)*. 2016, vol. 5(4), pp. 1-18. ISSN 2076-3921.
 69. DALTO, D., MATTE, J. Pyridoxine (vitamin B) and the glutathione peroxidase system; a link between one-carbon metabolism and antioxidation. In: *Nutrients*. 2017, vol. 9(3), 189. ISSN (online) 2072-6643.
 70. DANESI, E., et al. Application of *Spirulina platensis* in protein enrichment of manioc based bakery products. In: *Journal of Biotechnology*. 2010, vol. 150, 311. ISSN (online) 1873-4863.
 71. DELRUE, F. et al. Optimization of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. In: *Fermentation* 2017, vol. 3(4), 59. ISSN 2311-5637.
 72. DEMBITSKY, V., GLORIOZOVA, T., POROIKOV, V. Biological activities of organometalloid (As, At, B, Ge, Si, Se, Te) steroids. In: *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017, vol. 7(11), pp. 184-202. ISSN (online) 2231-3354.
 73. DENG, R., CHOW, T. Hypolipidemic, antioxidant and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. In: *Cardiovascular Therapeutics*. 2010, vol. 28(4), pp. e33-e45. ISSN (online) 1755-5922.
 74. **DJUR, S.** Applications of inorganic germanium compounds for obtaining spirulina biomass enriched with germanium and bioactive compounds. În: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2020, Tom. XXVII, Issue 2, pp. 195-201. ISSN (online) 1844-7589.
 75. **DJUR, S.** Influence of $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ on some biologically active substances in *Spirulina platensis* biomass upon its cultivation. În: *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2019, Tom XXVI, Issue 1, pp. 51-56. ISSN (online) 1844-7589.
 76. **DJUR, S.,** CHIRIAC, T., RUDI, L., RUDIC, V. Organic germanium compounds on the basis of *Spirulina platensis*. In: *International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition)*, October 9-10, 2014, Chișinău, Republica Moldova, p. 123. ISBN 978-9975-4432-8-9.
 77. DOBRZYŃSKI, D., BOGUSZEWSKA-CZUBARA, A., SUGIMORI, K. Hydrogeochemical and biomedical insights into germanium potential of curative waters: a

- case study of health resorts in the Sudetes Mountains (Poland). In: *Environmental geochemistry and health*. 2018, vol. 40(4), pp. 355-1375. ISSN 0269-4042.
78. DOS SANTOS, M., DA SILVA JÚNIOR, F.M.R., MUCCILLO-BAISCH, A.L. Selenium content of Brazilian foods: A review of the literature values. In: *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017, vol. 58, pp. 10-15. ISSN (online) 1096-0481.
 79. DUNTAS, L., BENVENGA, S. Selenium: An element for life. In: *Endocrine*. 2015, vol. 48(3), pp. 756-77. ISSN (online) 1559-0100.
 80. EL-SHEEKH, M., ABOMOHR, E. F. The therapeutic potential of Spirulina to combat COVID-19 infection. In: *Egyptian Journal of Botany*. 2020, vol. 60(3), pp. 605-609. ISSN 0375-9237.
 81. ENCARNACÃO, T. et al. Cyanobacteria and microalgae: a renewable source of bioactive compounds and other chemicals. In: *Science Progress*. 2015, vol. 98(2), pp. 145-168. ISSN (online) 2047-7163.
 82. ESTRADA, P. et al. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. In: *Farmaco*. 2001, vol. 56(5-7), pp. 497-500. ISSN (online) 1879-0569.
 83. EVANS, S., KHAIRUDDIN, P., JAMESON, M. Optimizing selenium for modulation of cancer treatments. In: *Anticancer Research*. 2017, vol. 37(12), pp. 6497-6509. ISSN (online) 1791-7530.
 84. FAIRWEATHER-TAIT, S., COLLINGS, R., HURST, R., Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010, vol. 91(5), pp. 1484S-1491S. ISSN (online) 1938-3207.
 85. FERNANDES, J. et. al. Selenium at the redox interface of the genome, metabolome and exposome. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 2018, vol. 127, pp. 215-227. ISSN (online) 1873-4596.
 86. FISET, C. et al. Methodological biases in estimates of macroalgal macromolecular composition. In: *Limnology and Oceanography Methods*. 2017, vol. 15(7), pp. 618-630. ISSN 1541-5856.
 87. FOLIN, O., CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. In: *Journal of Biological Chemistry*. 1927, vol. 73(2), pp. 627-650. ISSN (online) 1083-351X.
 88. FRACZEK, A., PASTERNAK, K. Selenium in medicine and treatment. In: *Journal of Elementology*. 2013, vol. 18, pp. 145-163. ISSN 1644-2296.
 89. FRONTASYEVA, M. et. al. Accumulation of trace elements by biological matrix of *Spirulina platensis*. In: *Ecological Chemistry and Engineering S*. 2009, vol. 16(3), pp. 277-285. ISSN (online) 2084-4549.

90. FURST, A. Biological testing of germanium. In: *Toxicology and Industrial Health*. 1987, vol. 3(1), pp.166-204. ISSN (online) 1477-0393.
91. GALASSO, C. et al. Microalgal derivatives as potential nutraceutical and food supplements for human health: a focus on cancer prevention and interception. In: *Nutrients*. 2019, vol. 11(6), pp. 12-26. ISSN (online) 2072-6643.
92. GARCÍA, J., DE VICENTE, M., GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. In: *Microbial Biotechnology*. 2017, vol. 10(5), pp. 1017-1024. ISSN (online) 1751-7915.
93. GAROUSHI, F. The essentiality of selenium for humans, animals, and plants, and the role of selenium in plant metabolism and physiology. In: *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*. 2017, vol.10(1), pp. 75-90. ISSN (online) 066-7744.
94. GENITTY, J. M., et al. The binding of selenium to the lipids of two unicellular marine algae. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1986, vol. 118, p.176-182. ISSN (online) 1090-2104.
95. GHAENI, M., ROOMIANI, L., Review for application and medicine effects of *Spirulina*, *Spirulina platensis* microalgae. In: *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. 2016, vol. 3(2), pp. 114-117. ISSN (online) 2301-3737.
96. GLOCKLING, F. *The chemistry of germanium*. Academic Press, London & New York, 1969, 234 p. ISBN: 0122864506.
97. GOJKOVIC, Z. et. al. Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae. In: *Algal Research*. 2015, vol. 7, pp. 106-116. ISSN 2211-9264.
98. GORNALL, A., BARDAWILL, C., DAVID, M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. In: *Journal of Biological Chemistry*. 1949, vol. 177(2), pp. 751-766. ISSN (online) 1083-351X.
99. GOST R 51309-99 „Drinking water. Determination of elements content by atomic spectrometry methods”.
100. GUERREIRO, A. et al. Antioxidant and cytoprotective properties of cyanobacteria: potential for biotechnological applications. In: *Toxins (Basel)*. 2020, vol. 12(9), 548. ISSN (online) 2072-6651.
101. GULDAS, M., IRKIN, R. Influence of *Spirulina platensis* powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk. In: *Mljekarstvo*. 2010, vol. 60(4), pp. 237-243. ISSN (online)1846-4025.
102. GUPTA, M., GUPTA, S. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. In: *Frontiers in Plant Science*. 2017, vol. 7(11), pp. 1-14. ISSN 1664-462X.

- 103.GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G., FABILA-CASTILLO, L., CHAMORRO-CEVALLOS, G. Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina (Arthrospira)*. In: *Nutricion hospitalaria*. 2015, vol. 32, pp. 34-40. ISSN (online) 1699-5198.
- 104.HADIYANTO, H. et al. Phyocyanin extraction from microalgae *Spirulina platensis* assisted by ultrasound irradiation: effect of time and temperature. In: *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2016, vol. 38(4), pp. 391-398. ISSN (online) 2408-1779.
- 105.HAFSA, Y. et al. Evaluation of nutritional and sensory properties of bread enriched with *Spirulina*. In: *Annals. Food Science and Technology*. 2014, vol. 15(2), pp. 270-275. ISSN (online) 2344-4916.
- 106.HARIHARAN, S., DHARMARAJ, S. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. In: *Inflammopharmacology*. 2020, vol. 28, 667-695. ISSN (online) 1568-5608.
- 107.HATFIELD, D.L. et al. Selenium and cancer. In: COLLINS, J., eds. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*. Elsevier: Inc. Academic Press, 2016, pp. 463–473. ISBN (online): 9780128023761.
- 108.HAYASHI, T., et al. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. In: *Journal of Natural Products*. 1996, vol. 59(1), pp. 83-87. ISSN (online) 1520-6025.
- 109.HEATH, R., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1968, vol. 125(1), pp.189-198. ISSN (online) 1096-0384.
- 110.HEDGE, J., HOFREITER, B. Methods of estimating starch and carbohydrates. In: WHISTLER, R., BE MILLER, J. eds. *Carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press, NY. 1962, pp. 163-201.
- 111.HOSSEINI, S., KHOSRAVI-DARANI, K., MOZAFARI, M. Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. In: *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013, vol. 13(8), 1231-1237. ISSN (online) 1875-5607.
- 112.HOSSEINI, S., SHAHBAZIZADEH, S., MOZAFARI, M. *Spirulina platensis*: Food and Function. In: *Current Nutrition & Food Science*. 2013, vol. 9(3), pp. 189-193. ISSN (online) 2212-3881.
- 113.HUANG, Z., ROSE, A., HOFFMANN, P. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. In: *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012, vol. 16(7), pp. 705-743. ISSN (online) 1557-7716.

- 114.HUANG, Z. et al. Chemical composition and selenium distribution in selenium enriched *Spirulina platensis* biomass. In: *Chemistry of Natural Compounds*. 2006, vol. 42(6), pp. 636-640. ISSN (online) 1573-8388.
- 115.HUANG, Z., ZHENG, W., GUO, B. Optimization of cultivation conditions in se-enriched *Spirulina platensis*. In: *Chinese Journal of Biotechnology*. 2002, vol. 18(3), pp. 373-376. ISSN: 1872-2075.
- 116.ISMAIEL, M., EL-AYOUTY, Y., PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. In: *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, vol. 47(2), pp. 298-304. ISSN (online) 1678-4405.
- 117.JEYARAMAN, V., SELLAPPA, S. In-vitro anticancer activity of organic germanium on human breast cancer cell line (MCF-7). In: *Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2011, vol. 5, pp. 39-41. ISSN 0976-3171.
- 118.JHA, D., et al. Microalgae-based pharmaceuticals and nutraceuticals: an emerging field with immense market potential. In: *ChemBioEng Reviews*. 2017, vol. 4(4), pp. 257-272. ISSN (online) 2196-9744.
- 119.JIANG, J. et al. Synthesis and synergetic effects of chrysin–organogermanium (IV) complex as potential antioxidant. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, vol. 23(20), 5727-5732. ISSN (online) 1464-3405.
- 120.JI-XIANG, C. Effect of germanium dioxide on growth of *Spirulina platensis*. In: *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 1996, vol. 14(4) pp. 378-381. ISSN 0254-4059.
- 121.JOO, S. et al. Effect of Geranti Bio-Ge Yeast, a dried yeast containing biogermanium, on the production of antibodies by b cells. In: *Immune Network*. 2006, vol. 6(2), pp. 86-92. ISSN (online) 2092-6685.
- 122.KAJI, T. et al. Inhibition of cultured bovine aortic endothelial cell proliferation by sodium spirulan, a new sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. In: *Planta Medica*. 2002, vol. 68, pp. 505-509. ISSN 0032-0943.
- 123.KAJI, T. et al. Sodium spirulan as a potent inhibitor of arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. In: *Life Science*. 2004, vol. 74, pp. 2431-2439. ISSN (online) 2372-613X.
- 124.KAMAL, A., AHMAD, I. Cyanobacteria „the blue green algae” and its novel applications: A brief review. In: *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 2014, vol. 7(1), pp. 251-261. ISSN 2028-9324.

- 125.KAMAL, A., IQBAL, M., BHATTI, H. Therapeutic applications of selenium-derived compounds. In: *Reviews in Inorganic Chemistry*. 2018, vol. 38(2), pp. 49-76. ISSN (online) 2191-0227.
- 126.KAMENIDOU, I., AGGELOPOULOS, S., BATZIOS, A. Natural medical attributes and benefits of Spirulina: Segmentation based on consumers' knowledge. In: *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, vol. 5(14), pp. 3192-3199. ISSN 1996-0875.
- 127.KANG, D. et al. The role of selenium metabolism and selenoproteins in cartilage homeostasis and arthropathies. In: *Experimental and Molecular Medicine*. 2020, vol. 52(8), pp. 1198-1208. ISSN (online) 2096-6413.
- 128.KARKOS, P. et al. Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications. In: *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, vol. 2011, 531053. ISSN (online) 1741-4288.
- 129.KATO, M. et al. Water-soluble organic germanium promotes both cornified cell envelope formation and ceramide synthesis in cultured keratinocytes. In: *Cosmetics*. 2017, vol. 4(3), 33. ISSN 2079-9284.
- 130.KEITH, L. et al. Germanium-handbook on the toxicology of metals. Chapter 37. In: NORDBERG, G., NORDBERG, M., FOWLER, B. eds. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier Imprint: Academic Press. 2015, 4th Edition, pp. 799-816. ISBN 978-0-444-59453-2.
- 131.KESSI, J., HANSELMANN, K. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry*. 2005, vol. 279(49), pp. 50662-50669. ISSN (online) 1083-351X.
- 132.KHANAM, A., PLATEL, K. Bioaccessibility of selenium, selenomethionine and selenocysteine from foods and influence of heat processing on the same. In: *Food Chemistry*. 2016, vol. 194, pp. 1293-1299. ISSN 0308-8146.
- 133.KIELISZEK, M. Review Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. In: *Molecules*. 2019, vol. 24(7), 1298. ISSN 1420-3049.
- 134.KIELISZEK, M., BŁAZEJAK, S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: A review. In: *Molecules*. 2016, vol. 21(5), 609. ISSN 1420-3049.
- 135.KIM, E. et al. Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) treatment during in vitro culture protects fertilized porcine embryos against oxidative stress induced apoptosis. In: *Journal of Reproduction and Development*. 2017, vol. 63(6), pp. 581-590. ISSN 1348-4400.

- 136.KIM, H. et al. Preventive effect of selenium on chronic bacterial prostatitis. In: *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2012, vol. 18(1), pp. 30-34. ISSN (online) 1437-7780.
- 137.KINI, S. et al. Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications. In: SINGH, P., KUMAR, A., SINGH, V., SHRIVASTAVA, A. (eds) *Advances in cyanobacterial biology*, Academic Press, 2020, pp. 173-194. ISBN 9780128193112.
- 138.KLAPCINSKA, B., CHMIELOWSKI, J. Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 1986, vol. 51(5), pp. 1144-1147. ISSN (online) 1098-5336.
- 139.KOBAYASHI, A., OGRA, Y. Metabolism of tellurium, antimony and germanium simultaneously administered to rats. In: *Journal of Toxicological Sciences*. 2009, vol. 34(3), pp. 295-303. ISSN (online) 1880-3989.
- 140.KOCA, A. F., KOCA, I., TEKGULER, B. Two antioxidant elements of *Allium vegetables*: germanium and selenium. In: *Acta Horticulturae*. 2016, no 1143, pp. 297-302. ISSN 0567-7572.
- 141.KOYANDE, A. et al. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. In: *Food Science and Human Wellness*. 2019, vol. 8(1), pp. 16-24. ISSN 2213-4530.
- 142.KURŠVIETIENĖ, L., et al. Selenium anticancer properties and impact on cellular redox status. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020, vol. 9(1), 80. ISSN (online) 2076-3921.
- 143.KURT, O., ZHANG, J., PINKERTON, K. Pulmonary health effects of air pollution. In: *Current opinion in pulmonary medicine*. 2016, vol. 22(2), pp. 138-143. ISSN (online) 1531-6971.
- 144.LABUNSKYY, V., HATFIELD, D., GLADYSHEV, V. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. In: *Physiological reviews*. 2014, vol. 94(3), pp. 739-77. ISSN (online) 1522-1210.
- 145.LAKHTIN, V. et al. Synthesis and application of organogermanium compound. In: *Polymer Science, Series D. Glues and Sealing Materials*. 2011, vol. 4(3), pp. 221-227. ISSN (online) 1995-4220.
- 146.LANDRIGAN, P., FULLER, R. Global health and environmental pollution. In: *International Journal of Public Health*. 2015, vol. 60(7), pp. 761-762. ISSN 1661-8564.
- 147.LAU, N., MATSUI, M., ABDULLAH, A. Cyanobacteria: photoautotrophic microbial factories for the sustainable synthesis of industrial products. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2015, vol. 2, pp. 1-9. ISSN (online) 1110-7251.

- 148.LEE, H, TREVORS, J., VAN DYKE, M. Microbial interactions with germanium. In: *Biotechnology Advances*. 1990, vol. 8(3), pp. 539-546. ISSN (online) 1873-1899.
- 149.LEE, J. et. al. Oral single- and repeated-dose toxicity studies on Geranti Bio-Ge yeast, organic germanium fortified yeasts, in rats. In: *The Journal of Toxicological Sciences*. 2004, vol. 29(5), pp. 541-553. ISSN (online) 1880-3989.
- 150.LEMES, A., et al. Fresh pasta production enriched with *Spirulina platensis* biomass. In: *Brazilian Archives of Biology and Tecnology*. 2012, vol. 55, pp. 15-25. ISSN (online) 1678-4324.
- 151.LEWIN, J. Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. In: *Phycologia*. 1966, vol. 6(1), pp. 1-12. ISSN (online) 0031-8884.
- 152.LI, L. et al. Advances in effect of germanium or germanium compounds on animals - a review. In: *Journal of Biosciences and Medicines*. 2017, vol. 5, pp. 56-73. ISSN (online) 2327-509X.
- 153.LI, Y. et al. Phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* (*Spirulina*): a new source of peptides with dipeptidyl peptidase-iv inhibitory activity. In: *Nutrients*. 2020, vol. 12(3): 794, pp. 1-12. ISSN (online) 2072-6643.
- 154.LI, Z., GUO, S., LI, L. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. In: *Bioresource Technology*. 2003, vol. 89(2), pp. 171-176. ISSN 0960-8524.
- 155.LISBOA, C., PEREIRA, A., COSTA, J. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina sp. LEB 18*. In: *African Journal of Microbiology Research*. 2016, vol. 10(3), pp. 79-86. ISSN 1996-0808.
- 156.LIU, Q. et al. Medical applicationa of *Spirulina platensis* derived C-Phycocianin. In: *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016, vol. 2016, 7803846. ISSN (online) 1741-4288.
- 157.LIU, Y. et al. Mechanism and application of germanium in plant growth. In: *Chinese Journal of Eco-Agriculture*. 2015, vol. 23(8), pp. 931-937. ISSN 1671-3990.
- 158.LJUBIC, A. et al. Biomass composition of *Arthrospira platensis* during cultivation on industrial process water and harvesting. In: *Journal of Applied Phycology*. 2018, vol. 30(2), pp. 943-954. ISSN 0921-8971.
- 159.LOURENÇO, S., MOLDÃO-MARTINS, M., ALVES, V. Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications. In: *Molecules*. 2019, vol. 24(22), pp. 1-25. ISSN (online) 1420-3049.

- 160.LOWRY, O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent In: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, vol. 193(1), pp. 265-275. ISSN (online) 1083-351X.
- 161.LUCK, B. E. et al. Renal and other organ failure caused by germanium intoxication. In: *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1999, vol. 14(10), pp. 2464-2468. ISSN (online) 1460-2385.
- 162.LUPATINI, A. et al. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. In: *Food Research International*. 2017, vol. 99(3), pp. 1028-1035. ISSN 0963-9969.
- 163.LYONS, M., PAPAZYAN, T., SURAI P. Selenium in food chain and animal nutrition: lessons from nature - review. In: *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 2007, vol. 20(7), pp. 1135-1155. ISSN (online) 1011-2367.
- 164.MACFARQUHAR, J. K., et al. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. In: *Archives of Internal Medicine*. 2010, vol. 170(3), pp. 256-261. ISSN (online) 1538-3679.
- 165.MADER, J. et al. Calcium spirulan derived from *Spirulina platensis* inhibits herpes simplex virus 1 attachment to human keratinocytes and protects against herpes labialis. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016, vol. 137(1), pp. 197-203. ISSN 0091-6749.
- 166.MALIK, P., KEMPANNA, C., PAUL, A. Quality characteristics of ice cream enriched with spirulina powder. In: *International Journal of Food and Nutritional Sciences*. 2013, vol. 2(1), pp. 44-50. ISSN 2320-7876.
- 167.MARCZENKO, Z., BALCERZAK, M. *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis*. E-book type: Imprint: Elsevier, 2000. 521 p. ISBN 978-0-444-50524-8.
- 168.MARKHAM, W., HAGMEIER, E. Observations on the effects of germanium dioxide on the growth of macro-algae and diatoms. In: *Phycologia*. 1982, vol. 21(2), pp. 125-130. ISSN (online) 0031-8884.
- 169.MARLES, R. et al. United states pharmacopeia safety evaluation of spirulina. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, vol. 51(7), pp. 593-604. ISSN (online) 1549-7852.
- 170.MARTÍNEZ-GALERO, E. et. al. Preclinical antitoxic properties of Spirulina (Arthrospira). In: *Pharmaceutical Biology*. 2016, vol. 54(8), pp. 1345-1353. ISSN (online) 1744-5116.
- 171.MARZORATI, S. et al. Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from Spirulina: supercritical CO₂ and water extraction methods for added value products cascade. In: *Green Chemistry*. 2020, vol. 22(1), pp. 187-196. ISSN (online) 1463-9270.

- 172.MATHUR, M. Bioactive Molecules of Spirulina: A Food Supplement. In: MÉRILLON, J., RAMAWAT, K., eds. *Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry*. Switzerland: Springer, Cham. 2018, ISBN (online) 978-3-319-54528-8.
- 173.MATONDO, F. et al. Spirulina supplements improved the nutritional status of undernourished children quickly and significantly: experience from Kisantu, the Democratic Republic of the Congo. In: *International Journal of Pediatrics*. 2016, vol. 2016, 1296414. ISSN 2345-5055.
- 174.MATSUMOTO, H. et al. Restorative effect of organic germanium compound (Ge-132) on dermal injury. In: *Wound Medicine*. 2016, vol. 15, pp. 6-10. ISSN 2213-9095.
- 175.MATUFI, F., MAGHSUVI, H., CHOOPANI, A. Spirulina and its role in immune system: A review. In: *Journal of Immunology Research and Therapy*. 2020, vol. 5(1), pp. 204-211. ISSN 2472-727X.
- 176.MEHDI, Y. et al. Review: Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. In: *Molecules*. 2013, vol. 18(3), pp. 3292-3311. ISSN 1420-3049.
- 177.MEHER, B. et al. Nutritional composition and pharmacological actions of spirulina. In: *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, vol. 6(3), p. 52-56. ISSN 2249-1848.
- 178.MENCHIKOV, L., IGNATENKO, M. Biological activity of organogermanium compounds (A Review). In: *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013, vol. 46(11), pp. 635-638. ISSN (online) 1573-9031.
- 179.MICHAEL, A., KYEWALYANGA, M., LUGOMELA, C. Biomass and nutritive value of *Spirulina (Arthrospira fusiformis)* cultivated in a cost-effective medium. In: *Annals of Microbiology*. 2019, vol. 69(13), pp. 1387-1395. ISSN 1590-4261.
- 180.MICHAEL, A. et al. Antioxidant activity of the cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) fusiformis* cultivated in a low-cost medium. In: *African Journal of Food Science*. 2018, vol. 12(8), pp. 188-195. ISSN 2141-5455.
- 181.MICZKE, A., et al. Effects of spirulina consumption on body weight, blood pressure, and endothelial function in overweight hypertensive Caucasians: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. In: *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2016, vol. 20(1), pp. 150-156. ISSN 1128-3602.
- 182.MIN, S. et al. Genotoxicity studies on Geranti Bio-Ge Yeast®, an organic germanium synthesized in yeasts. In: *Laboratory Animal Research*. 2004, vol. 20(1), pp. 81-88. ISSN (online) 2233-7660.
- 183.MISHIMA, T., et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. In:

- Clinical & Experimental Metastasis*. 1998, vol. 16(6), pp. 541-550. ISSN (online) 1573-7276
184. MOLNÁR, S. et al. Comparative studies on accumulation of selected microelements by *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* with the prospects of functional food development. In: *Journal of Chemical Engineering and Process Technology*. 2013, vol. 4, pp. 4-7. ISSN 2157-7048.
 185. MORSY, O. et al. Production and evaluation of some extruded food products using spirulina algae. In: *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*. 2014, vol. 52(4), pp. 329-342. ISSN 1110-0419.
 186. MOSTOLIZADEH, S. et al. Effects of incorporation *Spirulina platensis* (Gomont, 1892) powder in wheat flour on chemical, microbial and sensory properties of pasta. In: *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2020, vol. 19(1), pp. 410-420. ISSN 1562-2916.
 187. MURDOLO, G. et al. Selenium and cancer stem cells. In: *Advances in Cancer Research*. 2017, vol. 136, pp. 235-257. ISSN 0065-230X.
 188. NICKEL, A., et al. Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters. In: *Chemico-Biological Interactions*. 2009, vol. 177(3), pp. 234-41. ISSN (online) 1872-7786.
 189. NIEDZIELSKI, P. Et al. Selenium species in selenium fortified dietary supplements. In: *Food Chemistry*. 2016, vol. 190, pp. 454-459. ISSN 0308-8146.
 190. NOAMAN, E. Germanium Against Cancer In: BADAWI, A., eds. *Important facts about cancer prevention*. Publisher: Trafford Publisher, 2012, pp. 77-98. ISBN: 978-1-4669-5359.
 191. NUHU, A. Review Article *Spirulina (Arthrospira)*: An important source of nutritional and medicinal compounds. In: *Journal of Marine Biology*. 2013, vol. 1, pp. 1-8. ISSN 1687-9481.
 192. OBARA, K. et al. Germanium poisoning: clinical symptoms and renal damage caused by long-term intake of germanium. In: *Japanese Journal of Medicine*. 1991, vol. 30(1), pp. 67-72. ISSN (online) 2516-7103.
 193. ODULARU, A. Anticancer activities of organogermanium compounds. In: *International Journal of Progressive Sciences and Technologies*. 2016, vol. 3(1), pp. 23-25. ISSN 2509-0119.
 194. OGWAPIT, S. Analysis of Ge-132 and development of a simple oral anticancer formulation. In: *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*. 2011, vol. 4(2), pp. 128-139. ISSN 1754-7431.

- 195.OKECHUKWU, P. N. et al. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic and antioxidant activity of spirulina. In: *Pharmacognosy Magazine*. 2019, vol. 15(62), pp.17-29. ISSN (online) 0976-4062.
- 196.OLIVEIRA, D. et al. Advances in the biotechnological potential of brazilian marine microalgae and cyanobacteria. In: *Molecules*. 2020, vol. 25(12), 2908. ISSN 1420-3049.
- 197.OMI, R. et al. Reaction mechanism and molecular basis for selenium/sulfur discrimination of selenocysteine lyase. In: *Journal of Biological Chemistry*. 2010, vol. 285, pp. 12133-12139. ISSN (online) 1083-351X.
- 198.OROPEZA-MOE, M., WISLØFF, H., BERNHOFT, A. Selenium deficiency associated porcine and human cardiomyopathies. In: *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015, vol. 31, 148-156. ISSN (online) 1878-3252.
- 199.PAGELS, F. et al. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. In: *Biotechnology Advances*. 2019, 37(3), pp. 422-443. ISSN (online) 1873-1899.
- 200.PARK, J. et al. Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. In: *Algae*. 2016, vol. 31(4), pp. 391-401. ISSN (online) 2093-0860.
- 201.PARVEEN, N. S. Antidiabetic and antioxidant properties of spirulina - A review. In: *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2016, vol. 9(11), pp. 2034-2036. ISSN (online) 0974-360X.
- 202.PHIRI, F. et al. The risk of selenium deficiency in Malawi is large and varies over multiple spatial scales. In: *Scientific Reports*. 2019, 9(1), 6566. ISSN (online) 2045-2322.
- 203.PI, J. et al. Synthesis and biological evaluation of Germanium(IV)–polyphenol complexes as potential anti-cancer agents. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, vol. 23(10), pp. 2902-2908. ISSN 1464-3405.
- 204.PINOTTI, L. et al. The role of animal nutrition in designing optimal foods of animal origin as reviewed by the COST Action Feed for Health (FA0802). In: *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 2014, vol. 18(4), pp. 471-479. ISSN (online) 1780-4507.
- 205.ŁACZEK, A. et al. Methods for enrichment of animal diets with selenium. In: *Journal of Elementology*. 2019, vol. 24(3), pp. 1159-1172. ISSN 1644-2296.
- 206.PONTON, D. et. al. Selenium interactions with algae: chemical processes at biological uptake sites, bioaccumulation, and intracellular metabolism. In: *Plants*. 2020, vol. 9(4), 528. ISSN 2223-7747.

207. PRONINA, N.A. et al. The effect of selenite ions on growth and selenium accumulation in *Spirulina platensis*. In: *Russian Journal of Plant Physiology*. 2002, vol. 49, pp. 235-241. ISSN (online) 1608-3407.
208. PRÜSS-USTÜN, A. et al. Environmental risks and non-communicable diseases. In: *British Medical Journal*. 2019, vol. 364:1265. ISSN (online) 1756-1833.
209. PYNE, P.K., BHATTACHARJEE, P., SRIVASTAV, P.P. Microalgae (*Spirulina platensis*) and its bioactive molecules: Review. In: *Indian Journal of Nutrition*. 2017, vol. 4(2), 160. ISSN: 2395-2326.
210. RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, vol. 26(9-10), pp. 1231-1237. ISSN (online) 1873-4596.
211. REDDEMAN, R. et al. A toxicological evaluation of germanium sesquioxide (organic germanium). In: *Journal of Toxicology*. 2020, vol. 2020, Article ID 6275625. ISSN (online) 1687-8205.
212. RIJKENS, F. et al. *Investigations in the field of organogermanium chemistry*. Netherlands, Germanium Research Committee 1964, pp. 95-115. ASIN B0007JCP66.
213. ROMAN, M., JITARU, P., BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. In: *Metallomics*. 2013, vol. 6(1), pp. 25-54. ISSN (online) 1756-591X.
214. ROSENBERG, E. Germanium-containing compounds, current knowledge and applications. In: KRETSINGER, R., UVERSKY, V., PERMYAKOV, E. eds. *Encyclopedia of metalloproteins*. New York: Springer, 2013, pp. 847-856. ISBN (online) 978-1-4614-1533-6.
215. RUIZ, A., SOLA, P., PALMEROLA, N. Germanium: current and novel recovery processes. In: LEE, S. eds. *Advanced material and device applications with germanium*. London: InTechOpen, 2018, pp. 9-29. ISBN (online) 978-1-83881-724-4.
216. SAHARAN, V., JOOD, S. Nutritional composition of *Spirulina platensis* powder and its acceptability in food products. In: *International Journal of Advanced Research*. 2017, vol. 5(6), pp. 2295-2300. ISSN 2320-5407.
217. SALEHIFAR, M., et al. Possibility of using microalgae *Spirulina platensis* powder in industrial production of Iranian traditional cookies. In: *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2013, vol. 7(4), pp. 63-72. ISSN (online) 1755-4349.
218. SANTOS, L. et al. Selenium and selenoproteins in immune mediated thyroid. In: *Diagnostics (Basel)*. 2018, vol. 8(4), 70. ISSN 2075-4418.

- 219.SANTOS-BALLARDO, D. et al. A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture. In: *Aquaculture*. 2015, vol. 448, pp. 87-92. ISSN 0044-8486.
- 220.SARAF, P., SAO, A., BAGCHI, D. Antioxidant modulation in response to selenium induced oxidative stress in unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. In: *African Journal of Microbiology Research*. 2017, vol. 11(33), pp. 1321-1328. ISSN 1996-0808.
- 221.SCHIAVON, M. et. al. Selenium accumulation and metabolism in algae. In: *Aquatic Toxicology*. 2017, vol. 189, pp. 1-8. ISSN (online) 879-1514.
- 222.SCHWARZ, K., FOLTZ, C. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. In: *Journal of the American Chemical Society*. 1957, vol. 79(12), pp. 3292-3293. ISSN 0002-7863.
- 223.SEGHIRI, R., KHARBACH, M., ESSAMRI, A. Functional composition, nutritional properties, and biological activities of Moroccan *Spirulina* microalga. In: *Journal of Food Quality*. 2019, vol. 2019, 3707219. ISSN (online) 1745-4557.
- 224.SELLAPPA, S., JEYARAMAN, V. Antibacterial properties of organic germanium against some human pathogens. In: *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011, vol. 2(1), pp. 854–859. ISSN 0975-6299.
- 225.SELMI, C., et al. The effects of spirulina on anemia and immune function in senior citizens. In: *Cellular & Molecular Immunology*. 2011, vol. 8, pp. 248-54. ISSN 2042-0226.
- 226.SHAHID, M. et al. A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. In: *Environmental Pollution*. 2018, vol. 234, pp. 915-934. ISSN 0269-7491.
- 227.SHAO, W., et al. Pharmaceutical applications and consequent environmental impacts of *Spirulina* (*Arthrospira*): An overview. In: *Grasas Aceites*. 2019, vol. 70(1), e292. ISSN (online) 1988-4214.
- 228.SHIMADA, Y. et al. The organogermanium compound Ge-132 interacts with nucleic acid components and inhibits the catalysis of adenosine substrate by adenosine deaminase. In: *Biological Trace Element Research*. 2018, vol. 181(1), pp. 164-172. ISSN (online) 1559-0720.
- 229.SIEGELMAN, H., KYCIA, H. Algal biliproteins. In: HELLEBUST, J., CRAIGIE, J. eds. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, 1978, pp. 72-78. ASIN B000OB0F1Y.

- 230.SILVEIRA J., FAUSTINO, S., CUNHA, A. Bioprospection of biocompounds and dietary supplements of microalgae with immunostimulating activity: a comprehensive review. In: *PeerJ*. 2019, vol. 7, e7685. ISSN 2167-8359.
- 231.SIMSEK, N. et al. *Spirulina platensis* feeding inhibited the anemia- and leucopenia-induced lead and cadmium in rats. In: *Journal of Hazardous Materials*. 2009, vol. 164(2-3), pp. 1304-1309. ISSN 0304-3894.
- 232.SINGH, R. et al. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. In: *Frontiers in microbiology*. 2017, vol. 8, 515. ISSN (online) 1664-302X.
- 233.SIWULSKI, M. et al. The effects of germanium and selenium on growth, metalloids accumulation and ergosterol content in mushrooms: experimental study in *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum*. In: *European Food Research and Technology*. 2019, vol. 245(9), pp. 1799-1810. ISSN (online) 1438-2385.
- 234.SOBOLEV, O. et. al. Biological role of selenium in the organism of animals and humans. In: *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018, vol. 8(1) pp. 654-665. ISSN (online) 2520-2138.
- 235.SOBOLEV, O.I. et. al. Review of germanium environmental distribution, migration and accumulation. In: *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020, vol. 10(2), pp. 200-208. ISSN (online) 2520-2138.
- 236.SONANI, R. et al. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. In: *World Journal of Biological Chemistry*. 2016, vol. 7(1), pp. 100-109. ISSN (online) 1949-8454.
- 237.STANIC-VUCINIC, D. et al. *Spirulina* phycobiliproteins as food components and complements. In: JACOB-LOPES, E. eds. *Microalgal Biotechnology*. London: Intech Open Limited, 2018. pp. 129-149. ISBN: 978-953-51-6024-3.
- 238.STEINBRENNER, H. et al. Dietary selenium in adjuvant therapy of viral and bacterial infections. In: *Advances in Nutrition*. 2015, vol. 6(1), pp. 73-82. ISSN (online) 2156-5376.
- 239.STOFFANELLER, R., MORSE, N. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. In: *Nutrients*. 2015, vol. 7, pp. 1494-1537. ISSN (online) 2072-6643.
- 240.STRAND, T. et al. Assessment of selenium intake in relation to tolerable upper intake levels. In: *European Journal of Nutrition & Food Safety*. 2018, vol. 8(4), pp. 155-156. ISSN 2347-5641.

- 241.SUNDE, R. A. Regulation of glutathione peroxidase-1 expression. In: HATFIELD, D.L., BERRY, M.J., GLADYSHEV, V.N., eds. *Selenium*. Boston: Springer, MA. 2006, pp. 149-160. ISBN (online) 978-0-387-33827-9.
- 242.SUZUKI, F., BRUTKIEWICZ, R., POLLARD, R. Cooperation of lymphokine (s) and macrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-32). In: *Anticancer Research*. 1986, vol. 6(2), pp. 77-182. ISSN (online) 1791-7530.
- 243.SUZUKI, F., POLLARD, R. B. Prevention of suppressed interferon gamma production in thermally injured mice by administration of a novel organogermanium compound, Ge-132. In: *Journal of Interferon Research*. 1984, vol. 4(2), pp. 223-233. ISSN 0197-8357.
- 244.TAKEDA, T. et al. Organogermanium suppresses cell death due to oxidative stress in normal human dermal fibroblasts. In: *Scientific Repoprts*. 2019, vol. 9, 13637. ISSN (online) 2045-2322.
- 245.TANG, C. et. al. Selenium deficiency-induced redox imbalance leads to metabolic reprogramming and inflammation in the liver. In: *Redox Biology*. 2020, vol. 36, pp. 101519. ISSN 2213-2317.
- 246.TEZUKA, T. et al. Organogermanium (Ge-132) suppresses activities of stress enzymes responsible for active oxygen species in monkey liver preparation. In: *Advances in Enzyme Research*. 2017, vol. 5(2), pp. 13-23. ISSN (online) 2328-4854.
- 247.THOMAS, W., DODSON, A. Inhibition of diatom photosynthesis by germanic acid: Separation of diatom productivity from total marine primary productivity. In: *Marine Biology*. 1974, vol. 27, pp. 11-19. ISSN (online) 1432-1793.
- 248.TÓTH, R., CSAPÓ, J., The role of selenium in nutrition – A review. In: *Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria*. 2018, vol. 11(1), pp. 128-144. ISSN 2066-7744.
- 249.TRIANTIS, T.M., et al. Chemiluminescent studies on the antioxidant activity of amino acids. In: *Analytic Chimica Acta*. 2007, vol. 591(1), p. 106-111. ISSN 0003-2670.
- 250.TROFAST, J. Berzelius' Discovery of Selenium. In: *Chemistry International*. 2011, vol. 33(5), pp. 16-19. ISSN 2410-9649.
- 251.UDAYASREE, V., MANJULA, K. SOWJANYA, M. Effect of Spirulina as a nutritional supplement in malnourished children. In: *International Journal of Scientific Research*. 2013, vol. 2, pp. 2277-8179. ISSN (online) 2249-8052.
- 252.UDENIGWE, C.C., ALUKO, R.E. Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. In: *International journal of molecular sciences*. 2011, vol. 12(5), pp. 3148-3161. ISSN (online) 1422-0067.

- 253.VAN DYKE, M., LEE, H., TREVORS, J. Germanium accumulation by bacteria. In: *Archives of Microbiology*. 1989, vol. 152, pp. 533-538. ISSN (online) 1432-072X.
- 254.VATASSERY, G. et al. Use of the sulfo-phospho-vanillin reaction in a routine method for determining total lipids in human cerebrospinal fluid. In: *Clinical Biochemistry*. 1981, vol. 14(1), pp. 21-24. ISSN 0009-9120.
- 255.VAZ, B., et al. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. In: *Current Opinion in Food Science*. 2016, vol. 7, pp. 73-77. ISSN (online) 2214-8000.
- 256.VELIKYAN, I. et al. Organ biodistribution of Germanium-68 in rat in the presence and absence of [(68)Ga]Ga-DOTA-TOC for the extrapolation to the human organ and whole-body radiation dosimetry. In: *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2013, vol. 3(2), pp. 154-165. ISSN 2160-8407.
- 257.VENTURA, M., MELO, M., CARRILHO, F. Selenium and thyroid disease: From pathophysiology to treatment. In: *International Journal of Endocrinology*. 2017, vol. 2017(4), 1297658. ISSN (online) 1687-8345.
- 258.VINODHINI, J., SUDHA, S. Effect of bis-carboxy ethyl germanium sesquioxide on n-nitroso-n-methylurea-induced rat mammary carcinoma. In: *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013, vol. 6(2), pp. 242-244. ISSN (online) 2455-3891.
- 259.VISHTORSKAYA, A. et al. Assessing Ge-132 as an antioxidant in organic and water-containing media. In: *Journal of Organometallic Chemistry*. 2018, vol. 858(1), pp. 8-13. ISSN 0022-328X.
- 260.WADA, T. et al. Antioxidant activity of Ge-132, a synthetic organic germanium, on cultured mammalian cells. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2018, vol. 41(5), pp. 749-753. ISSN (online) 1347-5215.
- 261.WAEGENEERS, N. et al. Predicted dietary intake of selenium by the general adult population in Belgium. In: *Food Additives and Contaminants. Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2013, vol. 30(2), pp. 278-285. ISSN 0265-203X.
- 262.WANG, D. et al. Study on the accumulation and binding of germanium in *Spirulina platensis* cultured in two temperatures regimes. In: *Oceanologia et Limnologia Sinica*. 1999, vol. 30(6), pp. 646-651. ISSN 0029-814X.
- 263.WANG, L. et al. Study on antioxidant activity and amino acid analysis of rapeseed protein hydrolysates. In: *International Journal of Food Properties*. 2016, vol. 19(9), pp. 1899-1911. ISSN (online) 1532-2386.

264. WANG, N. et. al. Supplementation of micronutrient selenium in metabolic diseases: Its role as an antioxidant. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, vol. 2017(special), pp. 1-14. Article ID 7478523. ISSN (online) 1942-0994.
265. WASCHULEWSKI, I., SUNDE, R. Effect of dietary methionine on utilization of tissue selenium from dietary selenomethionine for glutathione peroxidase in the rat. In: *Journal of Nutrition*. 1988, vol. 118(3), pp. 367-374. ISSN (online) 1541-6100.
266. WHITE, P., BROADLEY, M. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diet - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. In: *New Phytologist*. 2009, vol. 182(1), pp. 49-84. ISSN (online) 1469-8137.
267. WHO/FAO/IAEA. Trace Elements in Human Nutrition and Health. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 1996
268. WICHE, O. et al. Germanium in the soil-plant system – a review. In: *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, vol. 25(32), pp. 31938-31956. ISSN (online) 0944-1344.
269. WINTER, F. S. et. al. The effect of *Arthrospira platensis* capsules on CD4 T-Cells and antioxidative capacity in a randomized pilot study of adult women infected with human immunodeficiency virus not under HAART in Yaoundé, Cameroon. In: *Nutrients*. 2014, vol. 6(7), pp. 2973-2986. ISSN (online) 2072-6643.
270. WOO, J., LIM, W. Anticancer effect of selenium. In: *Ewha Medical Journal*. 2017, vol. 40, pp. 17-21. ISSN (online) 2234-2591.
271. WRENCH, J. J. Selenium metabolism in the marine phytoplankters *Tetraselmus tetrathele* and *Dunaliella minuta*. In: *Marine Biology*. 1978, vol. 49, p. 231-236. ISSN (online) 1432-1793.
272. XIE, D. et al. Effects of five types of selenium supplementation for treatment of Kashin-Beck disease in children: a systematic review and network meta-analysis. In: *BMJ Open*. 2018, vol. 8(3), :e017883. ISSN (online) 2044-6055.
273. XU, D. et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, vol. 18(1), 96. ISSN 1422-0067.
274. YANAGIMOTO, M., SAITOH, H., KARLMOTO, N. Alkaline shift effect on the uptake of germanium by algae, *Chlorella ellipsoideae*, *Oscillatoria sp.* and *Spirulina platensis*. In: *Journal of Fermentation Technology*. 1983, vol. 61, pp. 233-238. ISSN 0385-6380.
275. YE, C. et al. Life cycle assessment of industrial scale production of spirulina tablets. In: *Algal Research*. 2018, vol. 34, pp. 154-163. ISSN 2211-9264.

- 276.YIMING, Z. et al Selenium deficiency causes immune damage by activating the DUSP1/NF- κ B pathway and endoplasmic reticulum stress in chicken spleen. In: *Food and Function*. 2020, vol. 11(7), pp. 6467-6475. ISSN 2042-6496.
- 277.YOKOI, K. Germanium, Toxicity. In: KRETSINGER, R., UVERSKY, V., PERMYAKOV, E. eds. *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York: Springer, 2013, pp. 33-89. ISBN (online) 978-1-4614-1533-6.
- 278.YU, D., LIU S. A study on adsorption of different inorganic selenium by spirulina platensis. In: *Acta Oceanologica Sinica*. 2000, vol. 22(2), pp. 137-141. ISSN (online) 1869-1099.
- 279.YU, F. et al. Prevention and control strategies for children Kashin–Beck disease in China. In: *Medicine*. 2019, vol. 98(36), p e16823. ISSN (online) 1536-5964.
- 280.YUHUI, Q., SHUTIAN, S., Effects of selenium (Se) on quality of *Spirulina platensis* (Sp.) In: *Journal of China Agricultural University*. 2000, vol. 5(1), pp. 31-34. ISSN 1007-4333.
- 281.ZAHRA, Z. Cyanobacteria: Rewiew of current potential and applications. In: *Environments*. 2020, vol. 7(13), 13. ISSN 2076-3298.
- 282.ZELINSKY, N. Biological activity of organogermanium compounds. (A Review). In: *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013, vol. 46(11), pp. 635-638. ISSN 0091-150X.
- 283.ZHANG, J. et al. Selenium and selenoproteins in viral infection with potential relevance to COVID-19. In: *Redox biology*. 2020, vol. 37, 101715. ISSN 2213-2317.
- 284.ZHANG, L., ZENG, H., CHENG, W.-H. Beneficial and paradoxical roles of selenium at nutritional levels of intake in healths pan and longevity. In: *Free Radical Biology and Medicine*. 2018, vol. 127, pp. 3-13. ISBN (online): 1873-4596.
- 285.ZHAO, Y. et. al. Toxic effect and bioaccumulation of selenium in green alga *Chlorella pyrenoidosa*. In: *Journal of Applied Phycology*. 2019, vol. 31(3), pp. 1733-1742. ISSN (online) 1573-5176.
- 286.ZHENG, H. Physiological function of organic germanium and its application in food. In: *Studies of Trace Elements and Health*. 2011, vol. 28, pp. 65-67. ISSN, 1005-5320.
- 287.ZHENG, H. et al. Effects of selenium supplementation on Graves’ disease: a systematic review and meta-analysis. In: *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2018, vol. 2018(6), 3763565. ISSN (online) 1741-4288.
- 288.ZHENG, J. et al. A review of public and environmental consequences of organic germanium. In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2019, vol. 50(13), pp. 1384-1409. ISSN (online) 1547-6537.

- 289.ZHENG, L., et al. Production and in vivo antioxidant activity of Zn, Ge, Se-enriched mycelia by *Cordyceps sinensis* SU-01. In: *Current Microbiology*. 2014, vol. 69(3), pp. 270-276. ISSN 1432-0991.
- 290.ZHENG, Y. et. al. Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. In: *Aquatic Toxicology*. 2017, vol. 183, pp. 21-27. ISSN (online) 879-1514.
- 291.ZHI-YONG LI, SI-YUAN GUO, LIN LI Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. In: *Bioresource Technology*. 2003, vol. 89(2), pp. 171-176. ISSN 0960-8524.
- 292.ZHONG, S. et al. Determination of total germanium in chinese herbal remedies by square-wave catalytic adsorptive cathodic stripping voltammetry at an improved bismuth film electrode. In: *International Journal of Electrochemistry*. 2013, vol. 2013(4), Article ID 735019. ISSN (online) 2090-3537.
- 293.ZHOU, Z. et al. Study on the accumulation of selenium and its binding to the proteins, polysaccharides and lipids from *S. maxima*, *S. platensis* and *S. subsalsa*. In: *Oceanologia et Limnologia Sinica*. 1997, vol. 28(4), pp. 363-370. ISSN 0029-814X.
- 294.ZHU, Y., WANG, D. Toxicity and bioaccumulation of germanium in two microalgae *Spirulina platensis* and *Dunaliella salina*. In: *Marine Sciences*. 2001, vol. 25(10), pp. 5-7. ISSN 2640-2300.
- 295.ZINICOVSCAIA, I. et al. Selenium uptake and assessment of the biochemical changes in *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass during the synthesis of selenium nanoparticles. In: *Canadian Journal of Microbiology*. 2017, vol. 63(1), pp. 27-34. ISSN (online) 480-3275.
- 296.ZOIDIS, E. et. al. Selenium-dependent antioxidant enzymes: actions and properties of selenoproteins. In: *Antioxidants (Basel)*. 2018, vol. 7(5): 66. ISSN 2076-3921.
- 297.ZWOLAK, I., ZAPOROWSKA, H. Selenium interactions and toxicity: A review. In: *Cell Biology and Toxicology*. 2012, vol. 28, pp. 31-46. ISSN (online) 1573-6822.

În limba rusă

- 298.АМБРОСОВ, И. и др. Использование органических соединений германия в медицине. В: *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015, № 2(11), с. 144-150. ISSN (online) 2658-5049.
- 299.БОГДЕВИЧ, О. П. и др. Оценка содержания селена в почвах Молдовы. В: *Buletinul Institutului de Geologie și Seismologie al AȘM*. 2005, № 1, с. 83-87. ISSN 1857-0046.

- 300.БОДНАР, О. и др. Особенности накопления селена и его биологическая роль у водорослей (обзор). В: *Гидробиологический журнал*. 2014, т. 50, № 5, с. 72-89. ISSN 0375-8990.
- 301.ВАСИЛЬЕВА, С. Г. *Накопление V, Li и Co клетками цианобактерий рода Spirulina (Arthrospira)*: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2012, 21 с.
- 302.ГАЛОЧКИН, А., ГАЛОЧКИНА, В. Органические и минеральные формы селена, их метаболизм, биологическая доступность и роль в организме. В: *Сельскохозяйственная биология*. 2011, № 43, с. 3-15. ISSN (online) 2313-4836.
- 303.ГОЛУБКИНА, Н. А., ХОТИМЧЕНКО, С.А., ТУТЕЛЬЯН, В.А. К вопросу обогащения пищевых продуктов селеном. В: *Микроэлементы в медицине*. 2003, вып. 4(4), с. 1-5. ISSN (online) 2413-6174.
- 304.ГРОМОВА, О. А. Витаминные и минеральные препараты. В: *Фармацевтический вестник*. 2003, № 2, с. 16-18.
- 305.ДЖУР, С., БУЛЬМАГА, В., ЗОСИМ, Л., РУДЬ, Л., КИРИЯК, Т., ЧЕПОЙ, Л., ГУЛЯ, А., РУДИК, В. Продуктивность и аккумуляция германия (IV) цианобактерией *Spirulina platensis* при выращивании на среде с добавлением германий - содержащих соединений. В: *Известия Академии Наук Молдовы. Науки о жизни*. 2020, № 1(340), с. 134-142. ISSN 1857-064X.
- 306.ДЖУР, С., БУЛЬМАГА, В., ЗОСИМ, Л., РУДЬ, Л., ЧЕПОЙ, Л., КИРИЯК, Т., ГУЛЯ, А., РУДИК, В. Изменение содержания белка и фикобилипротеинов в условиях накопления германия (IV) в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis* при выращивании на среде с германий - содержащими соединениями. В: *Известия Академии Наук Молдовы. Науки о жизни*. 2020, № 1(340), с. 142-151. ISSN 1857-064X.
- 307.ДЖУР, С., БУЛЬМАГА, В., КИРИЯК, Т., РУДИК, В. Полипептидный спектр суммарного белка спирулины культивируемой в присутствии соединений GeO_2 и GeSe_2 . В: *The Xth International Congress of Geneticists and Breeders*. 28 June - 1 July, 2015, Chisinau, Republic of Moldova, с. 185. ISBN 978-9975-933-56-8.
- 308.ДЖУР, С. В., КИРИЯК, Т. В., ЧЕПОЙ, Л. Е., РУДЬ, Л. Б., КОДРЯНУ, С. Н., ЛОСЕВА, Л. П., РУДИК, В. Ф. Получение биомассы цианобактерии *Spirulina platensis*, обогащенной германием. В: *IX Международная научная конференция посвященная 50-летию создания Института Микробиологии НАН Беларуси*. 7-11 сентября, 2015, Минск, с. 150. ISBN 978-985-08-1902-4.

- 309.ДЖУР, С. В., РУДИК, В. Ф. Получение новых иммуномодуляторных и противоопухолевых препаратов и нутрацевтиков на основе биомассы спироулины. В: *Тезисы Международной научно практической конференции молодых ученых „PONTUS EUXINUS”, по проблемам водных экосистем, посвященной 50 летию образования Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины.* 1–4 октября, 2013, Севастополь, с. 46-47. ISBN 978-966-02-6962-0.
- 310.ЕФРЕМОВА, Н. В. и др. Влияние некоторых металлокомплексов на содержание фикоцианина и активность супероксиддисмутазы в биомассе *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanophyta). В: *Альгология.* 2012, Т. 22, № 3, с. 251-258. ISSN (online) 1940-4328.
- 311.КАПИТАЛЬЧУК, М. В., КАПИТАЛЬЧУК, И. П., ГОЛУБКИНА, Н. А. Биогеохимия селена в Молдове. В: *Buletinul Institutului de Geologie și Seismologie al AȘM.* 2007, № 1, с. 10-15. ISSN 1857-0046.
- 312.КАПИТАЛЬЧУК, М. В., КАПИТАЛЬЧУК, И. П., ГОЛУБКИНА, Н. А. Аккумуляция и миграция селена в компонентах биогеохимической цепи «почва – растения – человек» в условиях Молдавии. В: *Поволжский Экологический Журнал.* 2011, № 3, с. 323-335. ISSN (online) 2541-8963.
- 313.КАПИТАЛЬЧУК, М. КАПИТАЛЬЧУК, И., ГОЛУБКИНА, Н. Селен в почвах Днестровско-Прутского междуречья. В: *Academicianul I.A. Krupenikov – 100 ani. Culegerea de articole științifice, 10 aprilie 2012.* Chișinău: Eco-TIRAS, 2012, pp. 115-117. ISBN 978-9975-66-231-4.
- 314.Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. Российская Академия Наук, Институт Физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва, 1991, с. 55-56.
- 315.КИРИЛЮК, В.П. *Микроэлементы в компонентах биосферы Молдовы.* Chișinău: Pontos, 2006. 156 с. ISBN 978-9975-72-206-3.
- 316.КОМАРОВ, Б. А и др. Элемент германий и биологическая активность его соединений. В: ЗЕЛЕНКОВ, В. ред. *Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сборник научных трудов.* Москва, 2016, вып. 24, с. 169-178. ISBN 978-5-94515-166-6.
- 317.КОМАРОВ, Б. А., ПОГОРЕЛЬСКАЯ, Л.В., АЛБУЛОВ, А.И. Об элементе германий и его содержании в некоторых лекарственных растениях. В: *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018, № 2, с. 58-61. ISSN (online) 2658-5049.

- 318.КУЛЬЧИЦКИЙ, Н.А., НАУМОВ, А.В. Современное состояние рынков селена и соединений на его основе. В: *Известия вузов. Цветная металлургия*. 2015, № 3, с. 40-48. ISSN (online) 1934-970X.
- 319.МАЗО, В.К., ГМОШИНСКИЙ, И.В., ШИРИНА, Л.И. *Новые пищевые источники эссенциальных элементов-антиоксидантов*. Москва: Миклош, 2009. 208 с. ISBN: 978-5-900518-96-1.
- 320.МИНЮК, Г. С., ДРОБЕЦКАЯ, И. В. Влияние селена на жизнедеятельность морских и пресноводных микроводорослей. В: *Экология моря*. 2000, вып. 54, с. 26-37. ISSN 0203-4646.
- 321.ПЕТРЯКОВ, В. В. Изучение физических свойств и состава питательных веществ микроводоросли *Spirulina platensis*, выращенной в лабораторных условиях. В: *Научный альманах*. 2015, № 2(4), с. 149-152. ISSN (online) 2411-7609.
- 322.ПРОНИНА, Н. А. и др. Влияние селенит-ионов на рост и накопление селена у *Spirulina platensis*. В: *Физиология растений*. 2002, Т. 49, № 2, с. 264-271. ISSN: 0015-3303.
- 323.РУМЯНЦЕВА, В.В., ХМЕЛЕВА, Е.В., ЖИЖИНА, Л.А. Перспективы использования микроводоросли *Spirulina platensis* в технологии леденцовой карамели повышенной пищевой ценности. В: *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2018, № 3, с. 20-25. ISSN 2310-1164.
- 324.ТАМБИЕВ, А. Х. Изучение возможностей обогащения биомассы цианобактерий *Spirulina platensis* и *Spirulina maxima*, являющихся объектами фотобиотехнологии, отдельными эссенциальными микроэлементами (обзор) В: *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012, № 2, с. 48-55. ISSN (online) 2587-7313.
- 325.ТАТКОВ, О. В. Опыт включения БАД «Сплат» в схемы санаторно - курортной реабилитации летного состава и членов их семей. В: *Рынок БАД*. 2003, № 6 (14).
- 326.ТРЕТЬЯК, Л. Н. Специфика влияния селена на организм человека и животных, применительно к проблеме создания селеносодержащих продуктов питания. В: *Вестник ОГУ*. 2007, №12, с. 136-145. ISSN (online) 1814-6465.
- 327.ТРОШИНА, Е.А., СЕНЮШКИНА, Е.С., ТЕРЕХОВА, М.А. Роль селена в патогенезе заболеваний щитовидной железы. В: *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2018, Т. 14, №4, с. 4-17. ISSN (online) 2310-3787.
- 328.ТУТЕЛЬЯН, В. А. и др. *Селен в организме человека: метаболизм, антиоксидантные свойства, роль в канцерогенезе*. М.: Издательство РАМН, 2002. 224 с. ISBN 5-7901-0023-6.

- 329.ТХАЗЕПЛОВА, Ф. Х., ИВАНОВА, З. А. Влияние внесения спирулины на процесс черствения хлебобулочных изделий из пшенично-ячменной муки. В: *Успехи современной науки и образования*. 2016, № 10, Т. 5, с. 41-43. ISSN (online) 2587-7380.
- 330.УПИТИС, В. *Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей*. Рига: ЗИНАТНЕ, 1983, 240 с.
- 331.ХМЕЛЕВА, Е.В. и др. Использование микроводоросли спирулина в технологии зернового хлеба. В: *Хлебопродукты*. 2018, №8, с. 50-54. ISSN 0235-2508.
- 332.ШЕСТАКОВА, Т.П. Использование селена в медицинской практике. В: *«РМЖ»*, 2017, №22, с. 1654-1659. ISSN 2225-2282.

ANEXE



MD 228 Z 2010.06.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **228** ⁽¹³⁾ **Z**

(51) Int. Cl.: *C12N 1/12* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C01G 17/04 (2006.01)
C07F 7/30 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

(21) Nr. depozit: s 2010 0021 (22) Data depozit: 2010.01.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.06.30, BOPI nr. 6/2010
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ESCUDIE Jean, FR; BULIMAGA Valentina, MD; RUDIC Valeriu, MD; ZOSIM Liliiana, MD; DJUR Svetlana, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la ficobiotehnologie, în particular la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* și poate fi aplicată în industria alimentară, farmaceutică și în medicină.

Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* include cultivarea spirulinei timp de 6...8 zile pe un mediu Zarrouk suplimentat cu dicloro-bis(2,4,6-trimetilfenil)germaniu, care se adaugă la

2
mediu în prima zi de cultivare în cantitate de 10...15 mg/L. Totodată, în primele 3 zile cultivarea se efectuează la o temperatură de 25°C, iar în următoarele zile – la temperatura de 30°C.

Revendicări: 1

10

MD 228 Z 2010.06.30



MD 4123 B1 2011.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4123 (13) B1

(51) Int. Cl.: C12N 1/12 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
C01B 19/00 (2006.01)
C01G 49/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2011 0028 (22) Data depozit: 2011.03.24	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.07.31, BOP nr. 7/2011
(71) Solicitanți: ȘOVA Sergiu, MD; RUDIC Valeriu, MD (72) Inventatori: ȘOVA Sergiu, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULIMAGA Valentina, MD; DJUR Svetlana, MD (73) Titulari: ȘOVA Sergiu, MD; RUDIC Valeriu, MD	

(54) Procedeu de obținere a selenitului de fier $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și procedeu de
cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu utilizarea acestuia

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la un procedeu de obținere a selenitului de fier și de utilizare a acestuia la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis*, cu un conținut sporit de seleniu și fier și poate fi aplicată în medicină și industria alimentară.

Se propune un procedeu simplu de obținere în condiții blânde a selenitului de fier(III) hexahidrat - $\text{Fe}_2\text{Se}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, care prevede interacțiunea la 55...65°C a soluțiilor apoase de fier(II) și H_2SeO_3 . Produsul rezultat prezintă o formă microcristalină a mineralului natural mandarinoid.

De asemenea se revendică un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care prevede prepararea unui mediu nutritiv ce conține, g/L: NaHCO_3 - 2,0, K_2HPO_4 - 0,5, NaNO_3 - 2,5, K_2SO_4 - 0,5, NaCl - 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2, CaCl_2 - 0,04, FeSO_4 - 0,01, EDTA - 0,08, precum și microelemente, introduse sub formă de o soluție separată - 1

2
mL, conținând la rândul său (g/L): H_3BO_3 - 2,86, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,81, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,22, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,08 și MoO_3 - 0,015. În continuare se inoculează cianobacteria menționată în concentrație de 0,40...0,45 mg/L, se efectuează cultivarea ei în decurs de 6 zile la temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminarea de 3000 lx și pH 9,5...10,5, după care se separă și se usucă biomasa obținută. Totodată la mediul nutritiv în primele trei zile de cultivare în calitate de sursă de seleniu și fier se adaugă porționat în suspensie selenitul de fier(III) menționat din calculul 0,015...0,030 g/L.

15
Rezultatul tehnic obținut constă în majorarea în biomasa cianobacteriei a conținutului de seleniu de 2,0...2,9 ori și a conținutului de fier de 1,4...2,9 ori.

Revendicări: 2

Figuri: 4

MD 4123 B1 2011.07.31

Acte de implementare a tehnologiilor de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor cu
conținut sporit de seleniu și germaniu



Ficotehfarm S. R. L.

MD 2028, str. Miorița 3/5, Chișinău, R. Moldova, tel/fax. 373(22) 73 50 07
e-mail: ficotehfarm@gmail.com, c/f 1004600074352, c/d 2224710SV89923657100, BC
„Mobiasbanca-Groupe Societe Generale” SA, MOBBMD22, cod TVA 0205964

Act de implementare: Nr. **01/11**

din **30 noiembrie 2017**

Prin prezenta, se confirmă faptul că pe parcursul anului 2017 la „FICOTEHFARM” SRL au fost efectuate lucrări de testare experimentală în condiții de fabricare în serie a *Tehnologiei de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de seleniu și în baza ei a materiilor prime biologice active pentru fabricarea produselor farmaceutice ce conțin seleniu bioorganic*.

Autorii elaborării: cercet. șt. Djur Svetlana, acad. Rudic V., dr. Chiriac T., dr. Rudi L., dr. Cepoi L., dr. Miscu V. (laboratorul Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM).

Locul și perioada desfășurării lucrărilor de testare experimentală: Ficotehfarm, Secția Producere Biomasa de spirulină; Secția fabricare Materii prime biologice active; laboratorul Control calitate (01.02.2017 – 30.05.2017).

Subiectul, conținutul și concluziile lucrărilor de testare experimentală: Conform etapelor descrise în prescripția de referință au fost reproduse în condiții de fabricare în serie: procesul de cultivare a cianobacteriei *Arthrospira/Spirulina platensis*, cu respectarea parametrilor – cheie de proces (selenitul de fier hexahidrat (50mg/l) și condițiile specifice de cultivare pentru a obține biomasa de spirulină cu conținut sporit de seleniu: suplimentarea sursei de seleniu în rate, pHul 8-8,5; temperatura 28-30°C; iluminarea de 37-55μM fotoni/m²/s, durata cultivării 144 ore. A fost fabricată partida experimentală de biomasa de spirulină – 001(FTF-SeBSp). Biomasa de spirulină a fost utilizată pentru obținerea extractului de aminoacizi și oligopeptide selenorganice – materie primă biologică pentru fabricarea preparatului selenocomponent – BioR-Selenium (001(FTF-ES-AAP/Se) și extractului selenoproteic (001(FTF-ES-P/Se).

Concluzii: Executarea tehnologiei în condițiile fluxului tehnologic elaborat s-a încadrat în limitele prescripției de referință, atât după parametri fizico-chimici (aspectul extern, starea de agregare, miros, culoare) cât și după cei calitativi (compoziție și cantitatea de seleniu). Compoziția materiilor prime biologice active nu s-a modificat peste limitele prescripției. Astfel, fabricarea acestor produse în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Director:
Dr. șt. biol., BOGDAN Valeriu

Farmacist diriginte, COMAN Svetlana

Laboratorul Ficobiotehnologie,
Dr. șt. biol. RUDI Ludmila

Cercet. șt. DJUR Svetlana



Rudi

Djur



Ficotehfarm S. R. L.

MD 2028, str. Miorița 3/5, Chișinău, R. Moldova, tel/fax. 373(22) 73 50 07
e-mail: ficotehfarm@gmail.com, c/f 1004600074352, c/d 2224710SV89923657100, BC
„Mobiasbanca-Groupe Societe Generale” SA, MOBBMD22, cod TVA 0205964

Act de implementare: Nr. **02/11**

din **30 noiembrie 2017**

Prin prezenta, se confirmă faptul că pe parcursul anului 2017 la „FICOTEHFARM” SRL au fost efectuate lucrări de testare experimentală în condiții de fabricare în serie a *Tehnologiei de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de germaniu (și seleniu), și în baza ei a materiilor prime biologice active pentru fabricarea produselor farmaceutice ce conțin germaniu (și seleniu) ca parte componentă activă.*

Autorii elaborării: cercet. șt. Djur Svetlana, acad. Rudic V., dr. Chiriac T., dr. Rudi L., dr. Cepoi L., dr. Miscu V. (laboratorul Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM).

Locul și perioada desfășurării lucrărilor de testare experimentală: Ficotehfarm, Secția Producere Biomasă de spirulină; Secția fabricare Materii prime biologice active; laboratorul Control calitate (01.06.2017 – 30.10.2017).

Subiectul, conținutul și concluziile lucrărilor de testare experimentală: Conform etapelor descrise în prescripția de referință au fost reproduse în condiții de fabricare în serie: procesul de cultivare a cianobacteriei *Arthrospira/Spirulina platensis*, cu respectarea parametrilor – cheie de proces (selenura de germaniu (30mg/l) și condițiile specifice de cultivare pentru a obține biomasa de spirulină cu conținut sporit de germaniu (ce conține și seleniu): suplimentarea sursei de germaniu (și seleniu) în rate, pHul = 8,5-10,5; temperatura 28-30°C; iluminarea de 37-55 μM fotoni/m²/s, durata cultivării 144 ore. A fost fabricată partida experimentală de biomasă de spirulină – 001(FTF-Ge(Se)BSp). Biomasa de spirulină a fost utilizată pentru obținerea extractului de aminoacizi și oligopeptide germaniu- și (seleniu) componente – materie primă biologică pentru fabricarea preparatului germaniu- și (seleniu) component – BioR Germanium+Selenium (001-(FTF-ES-AAP/Ge (Se)) și extractului germanoproteic (001-FTF-ES-P/Se).

Concluzii: Executarea tehnologiei în condițiile fluxului tehnologic elaborat s-a încadrat în limitele prescripției de referință, atât după parametri fizico-chimici (aspectul extern, starea de agregare, miros, culoare) cât și după cei calitativi (compoziție și cantitatea de germaniu (și seleniu). Compoziția materiilor prime biologice active nu s-a modificat peste limitele prescripției, iar fabricarea lor în serie este justificată din punct de vedere tehnologic, fizico-chimic și calitativ.

Director:

Dr. șt. biol., BOGDAN Valeriu

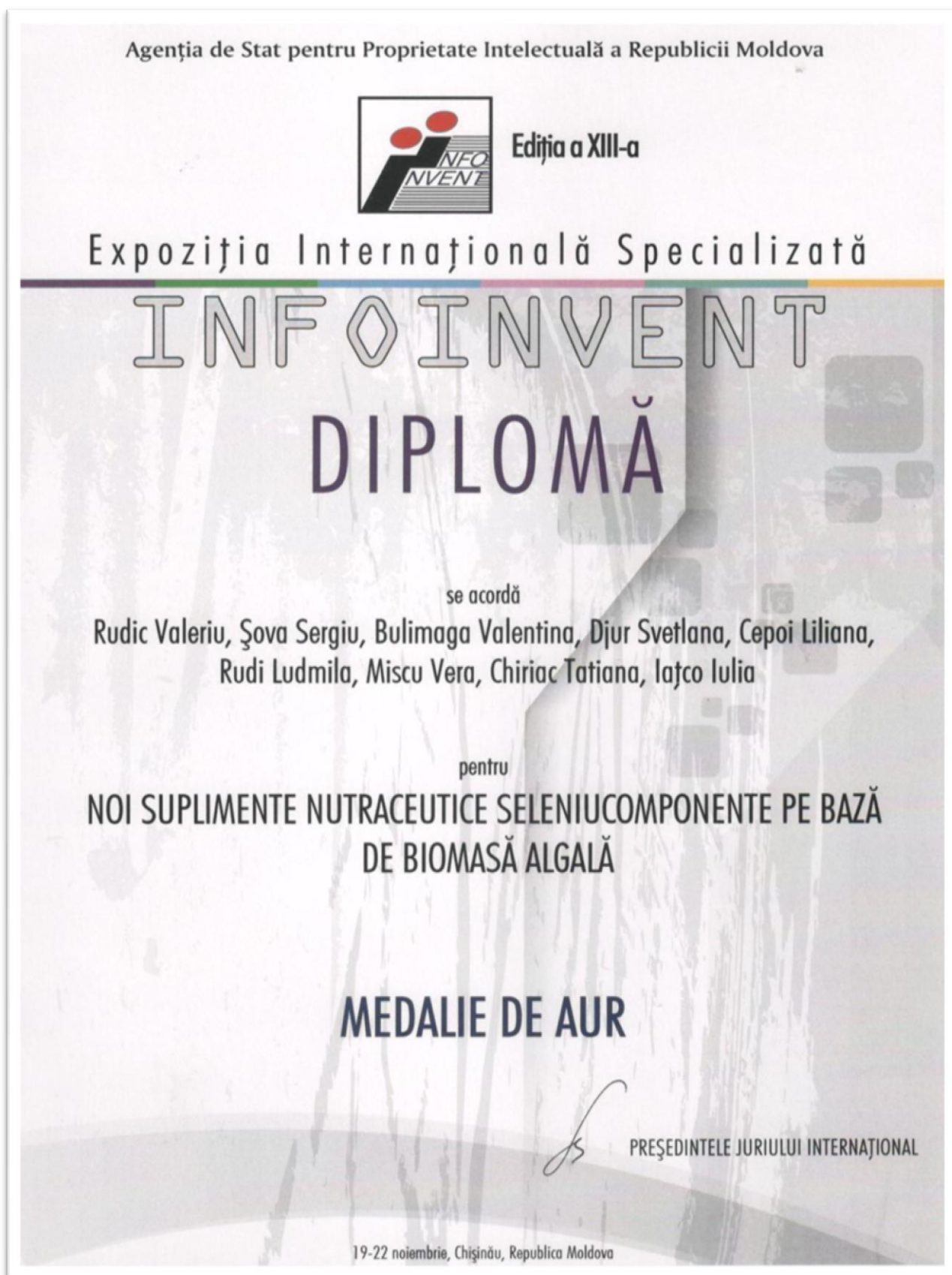
Farmacist diriginte, COMAN Svetlana

Laboratorul Ficobiotehnologie,

Dr. șt. biol. RUDI Ludmila

Cercet. șt. DJUR Svetlana







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

IAȘI - ROMÂNIA



DIPLLOMIA OF EXCELLENCE



NEW SELENIUM CONTAINING NUTRACEUTICALS FROM ALGAL BIOMASS

RUDIC V., ȘOVA S., BOGDAN V., DJUR S., CHIRIAC T.,
RUDI L., CEPOI L., MISCU V., BULIMAGA V., IATCO Iu.

EURO
INVENT

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

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU



EUROINVENT
2014

24 May 2014

DIPLOMĂ

— se acordă —

INSTITUTULUI DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL AȘM

Noi produse nutraceutice selenocomponente din biomasa algală

Autor

Rudic V., Șova S., Bogdan V., Djur S., Chiriac T., Rudi L., Cepoi L., Mîscu V., Bulimaga V., Iatco Iu.

cu ocazia celei de a 16-a ediții a

SALONULUI DE INVENȚII ȘI INOVAȚII

INVENTIKA

15 - 18 OCTOMBRIE 2014 | București, România

Mihnea COSTOIU

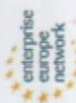
Ministru delegat



Cătălin TRIFU

Director General





budi 10. izvor

10. IZLOŽBA INOVACIJA, PROTOTIPOVA I STUDENTSKIH POSLOVNIH PLANOVA
I
39. HRVATSKI SAJAM INOVACIJA S MEĐUNARODNIM DJELOVANJEM



DODJELJUJE SE

DIPLOMA

RUĐIC VALERIJ, ŠOMA SERGIJ, BUJUNAČA VALERIJA, ĐOĐI SVETLANA, ČEĐI LILIJANA,
IME I PREZIME RUĐI LILIJANA, MIŠIĆ VERA, GRUBIĆ TATJANA, GHELSET VERA, INTIĆ JULIA

NOVI SELEKTI KOJI SADRŽI DODATKE IZ BIONAZE ALGI

INOVACIJA

ZA USPJEŠAN NASTUP I OSVOJENU ZLATNU MEDALJU NA

10. IZLOŽBI INOVACIJA, PROTOTIPOVA I STUDENTSKIH POSLOVNIH PLANOVA
I

39. HRVATSKOM SAJMU INOVACIJA S MEĐUNARODNIM DJELOVANJEM

F. Klapač

Tera Tehnopolis d.o.o.

Hrvatska udruga inovatora podzvetnika

J. Poldini

Hrvatski savez inovatora



IAȘI - ROMÂNIA



DIPLOMA

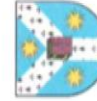
NEW NUTRACEUTICALS Imunobior® AND Aterobior®

RUDIC V., BALUTEL B., BOGDAN V., GULEA A.,
CAZACU D., CHIRIAC T., DJUR S., RUDI L., CEPOI L.

SILVER MEDAL

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

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU



EUROINVENT
2015

May 16, 2015



NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS,
JASSY, ROMANIA

Diploma GOLD MEDAL

INVENTICA 2015
with special mention of the jury

Offered Mr / Ms

**RUDIC V., BALUTEL B., BOGDAN V., GULEA A.,
CAZACU D., CHIRIAC T., DJUR S., RUDI L., CEPOI L.**

NEW NUTRACEUTICALS Imunobior® AND Aterobior®

in recognition of high scientific contribution
and loyalty to

**THE XIX-TH INTERNATIONAL EXHIBITION
OF RESEARCH, INNOVATION AND
TECHNOLOGICAL TRANSFER**

"INVENTICA 2015"

Iasi, Romania, June 24 -26 , 2015



PRESIDENT
INVENTICA 2015
Prof. Boris PLAHTEANU PhD

GENERAL MANAGER
NATIONAL INSTITUTE OF INVENTICS
Prof. Neculai SEGHEDEIN PhD



40TH INTERNATIONAL INVENTION SHOW
11TH INVENTION AND PROTOTYPE SHOW AND STUDENT
BUSINESS PLAN COMPETITION

Gold

RUDIC VALERIU, BALUTEL B.,
BOGDAN VALERIU, GULEA
AURELIAN, CAZACU D., CHIRIAC
TATIANA, DJUR S., RUDI L., CEPOI
LILIANA, MISCU V.
REPUBLIC OF MOLDOVA
NEW
NUTRACEUTICALS IMUNOBIOR® AN
D ATEROBIOR®

KARLOVAC, CROATIA, 05.-07. November 2015.

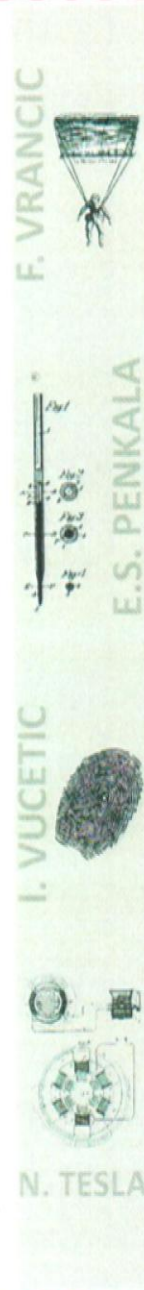


Međunarodni ocjenjivački sud
International Jury
Predsjednik/President
MScBA Andrej Škrinjar, univ.dipl.ing.stroj.

Andrej Škrinjar

Hrvatski savez inovatora
Croatian Inventors Association
Predsjednica/President
Ljiljana Pedišić, mag.ing.cheming.

Ljiljana Pedišić



ASSOCIATION OF POLISH INVENTORS AND RATIONALIZERS
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PATENT OFFICE
OF THE REPUBLIC OF POLAND



INTERNATIONAL WARSAW
INVENTION SHOW
IWIS 2016



**GOLD
MEDAL**

FOR

V. RUDIC, A. GULEA, V. BOGDAN, B. BALUTEL, D. CAZACU, T. CHIRIAC, S.
DJUR, L. RUDI, L. CEPOI

FROM

ACADEMY OF SCIENCES OF R. MOLDOVA
MOLDOVA

FOR THE INVENTION

NEW NUTRACEUTICALS BIOR®E, IMUNOBIOR® AND ATEROBIOR®



THE PRESIDENT OF JURY

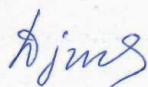
PROF. MICHAŁ SZOTA

WARSAW, 10-12TH OF OCTOBER 2016

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.

Djur Svetlana



Data 01.03.2021

CV al Autorului

Nume, prenume	DJUR Svetlana	
Data și locul nașterii:	22 iulie 1981, or. Ceadâr-Lunga,	
Cetățenie:	R. Moldova	
Studii:		
2004-2006	Universitatea de Stat din Moldova, doctorandă specialitatea 167.01. Biotehnologie, bionanotehnologie	
2002-2003	Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Biologie și Pedologie, specialitatea Ecologie și protecție a mediului, specialitatea Ecologie în cadrul catedrei Ecologie, Botanică și Silvicultură. Licențiată în Ecologie.	
1998-2002	Universitatea de Stat din Moldova, Institutul Științe Reale, specialitatea Ecologie și protecție mediului, studentă.	
Activitatea profesională:		
2013-Prezent	Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Laboratorul Ficobiotehnologie, cercetător științific	
2007-2012	Universitatea de Stat din Moldova, Laboratorul Ficobiotehnologie, cercetător științific	
Domenii de interes științific:	Biotehnologie, Microbiologie, Elaborarea procedeeleor și tehnologiilor de obținere a substanțelor bioactive din biomasa cianobacteriană și microalgă, elaborarea mediilor noi de cultivare.	
Participări la proiecte științifice naționale, bilaterale, și internaționale:	20.80009.5007.05. (2020-2023) Nanoparticule biofuncționalizate – obținerea cu ajutorul cianobacteriilor și microalgelor (MetBFN). <i>Executant</i> 15.817.05.01F (2015-2019) Stresul oxidativ indus de condițiile tehnologice și influența lui asupra calității biomasei de spirulină. <i>Executant</i> 17.80012.51.10A (2017–2018) Conservanți naturali de origine cianobacteriană pentru păstrarea microorganismelor. <i>Executant</i> 15.820.18.05.14/B (2015-2016) Tehnologie de utilizare a cianobacteriei <i>Spirulina platensis</i> pentru purificarea apelor reziduale cu perspectiva utilizării ulterioare a biomasei. <i>Executant</i> 13.820.18.01/BA (2013-2014) Elaborarea și implementarea tehnologiei de obținere a premixelor selencomponente în baza biomasei de spirulină. <i>Executant</i> 13.819.18.07A (2013-2014) Procedee inovative de valorificare a potențialului biosintetic al microalgei <i>Dunaliella salina</i> - superproducent de carotenoizi și glicerol. <i>Executant</i> 11.817.08.18F (2011-2014) Stabilirea mecanismelor de modificare a statutului oxidativ și a componenței biochimice a biomasei unor microalge sub acțiunea metalocomplexelor în scopul obținerii preparatelor antioxidante. <i>Executant</i> 11.817.08.44A (2011-2014) Elaborarea tehnologiilor de selectare și cultivare dirijată a	

tulpinilor de alge producătoare de substanțe biologice active și utilizarea biomasei algale. *Executant*.

9. 09.819.08.02A (2009-2010) Tehnologii noi de obținere a preparatelor antioxidante de origine naturală. *Executant*
10. 07.407.47T (2007-2008) Implementarea tehnologiilor de obținere și utilizare a preparatelor de origine algală la sporirea spermatogenezei la tauri și vieri. *Executant*
11. 45.009P (2004-2008) Nanotehnologii de sinteză a compușilor coordinativi noi ai Fe(III) și biotehnologii de obținere a produselor farmaceutice antianemice. *Executant*

Participări la manifestări științifice:

- Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”, USM, 10-11 noiembrie, 2020, Chișinău, R. Moldova;
- Al V-lea Simpozion științific național cu participare internațională „Biotehnologii avansate-realizări și perspective”, 21-22 octombrie, 2019, Chișinău, R. Moldova;
- The Xth International Congress of Geneticists and Breeders. 28 June - 1 July 2015, Chișinău, R. Moldova;
- IX Международная научная конференция посвященная 50-летию создания Института Микробиологии НАН Беларуси. 7-11 сентября 2015, Минск, Р. Беларусь;
- Vth International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”, November 3-5, 2014, Chișinău, R. Moldova;
- International Scientific Conference on Microbial Biotechnology (2nd edition), October 9-10, 2014, Chișinău, R. Moldova;
- Al III-lea Simpozion național cu participare internațională „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, 24-25 octombrie, 2013, Chișinău, R. Moldova;
- Международная научно практическая конференция молодых ученых „PONTUS EUXINUS”, по проблемам водных экосистем, посвященной 50 летию образования Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины. 1–4 октября 2013, Севастополь, Украина.

Lucrări științifice publicate la tema tezei de doctorat:

2 capitole în monografiile internaționale;

2 articole în revistă din străinătate recunoscută în monoautorat;

7 articole în reviste recenzate, categoria B și C (2 în monoautorat);

2 articole și 7 rezumate ale comunicărilor științifice la conferințe naționale și internaționale;

2 brevete de invenție.

Distincții:

Medalii de aur – 7, argint – 1, la:

- International Warsaw Invention Show IWIS 2016, Warsaw, 10-12 october 2016, Varșovia, Polonia; 40th International Invention Show;
- 11th Invention and prototype show and student Bussines plan competition, November 05-07, 2015, Karlovac, Croatia;
- The XIX-th International Exhibition of Research, Innovation and Technological Transfer ”INVENTICA”, June 24-26, 2015, Iasi, Romania;

- European Exhibition of Creativity and Innovation "EUROINVENT", May 14-16, 2015, Iasi, Romania;
- International Exposition for Inventions INOVA – 2014, 6-8 November 2014, Osijek, Croatia;
- Salonul Internațional de Invenții și Inovații INVENTIKA, 15-18 octombrie 2014, București, România;
- European Exhibition of Creativity and Innovation EUROINVENT, 22-24 May 2014 Iași, România;
- Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT, Ediția a XIII-a, 2013, Chișinău, Republica.

Date de contact:

Djur Svetlana, Laboratorul Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie
MD 2028, Chișinău, str. Academiei 1,
Tel.: +373 78740441, e-mail: djursvetlana@gmail.com