

MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

Ludmila RUDI, Tatiana CHIRIAC, Liliana CEPOI,
Vera MISCU, Ana VALUȚA,
Svetlana DJUR, Valeriu RUDIC

METODE DE ANALIZĂ
ÎN FICOBIOTEHNOLOGIE

Ghid metodic

Chișinău, 2020

CZU: 582.2:579.222(075.8)

M 61

Aprobat de Consiliul Științific al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie (Proces verbal nr. 7 din 25 noiembrie)

Ghidul propus sistematizează metodele de analiză specifice sau adaptate, aplicate în ficobiotehnologie în scopul determinării productivității și conținutului de biomasă, componenței biochimice a cianobacteriilor și microalgelor de interes biotehnologic (cianobacteriile *Arthrospira platensis* (*spirulina*), *Nostoc linckia*; microalgele *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Porphyridium cruentum*).

Ghidul a fost conceput drept suport metodic și didactic, și se adresează cercetătorilor științifici, doctoranzilor, masteranzilor și studenților de la specialitățile biologie, biologie aplicată, microbiologie, biotehnologie, ficobiotehnologie, tehnologii alimentare ș.a.

Autori: RUDI Ludmila, dr. șt. biol., CHIRIAC Tatiana, dr. șt. biol., CEPOI Liliana, dr. șt. biol., MISCU Vera, dr. șt. biol., VALUȚA Ana, dr. șt. biol., DJUR Svetlana, RUDIC Valeriu, dr. hab. șt. biol., prof. univ., acad.

Recenzenți:

1. ȘALARU Victor, dr. hab. șt. biol., prof. univ., Facultatea de Biologie și Pedologie, Universitatea de Stat din Moldova
2. CHISELIȚA Oleg, dr. șt. biol., I. P. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții

Metode de analiză în ficobiotehnologie : Ghid metodic / Ludmila Rudi, Tatiana Chiriac, Liliana Cepoi [et al.] ; Ministerul Educației, Culturii și Cercetării, Instituția Publică, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. – Chișinău: S. n., 2020 (Tipogr. "Artpoligraf"). – 101 p.: tab.
Bibliogr.: p. 99-101 (43 tit.). – 150 ex.

ISBN 978-9975-3462-9-0.

<https://doi.org/10.52757/9789975346290>

PREFAȚĂ

Asigurarea metodologică a cercetării constituie piatra de temelie a succesului în știință. Pornind de la acest postulat, ne-am pus drept scop înmănuncherea mai multor protocoale de investigații într-o culegere, ce ar servi drept suport cercetătorilor, care își realizează activitatea în domeniul ficobiotehnologiei, dar și pentru întreprinderile biotehnologice preocupate de producerea biomasei de cianobacterii, microalge și a produselor obținute din această biomasă.

Culegerea dată este destinată și tineretului studios – studenților facultăților de biologie și tehnologii alimentare, farmaceutice, care însușesc pe durata studiilor cursuri de metode analitice în domeniile respective.

Metodele de determinare a biomasei de cianobacterii și microalge sunt adaptate pentru utilizare în cazuri particulare, pentru speciile recunoscute în calitate de obiecte biotehnologice valoroase atât pe plan mondial, cât și regional. În cercetare aplicarea metodelor de determinare a biomasei permite de a aprecia adecvat rezultatele obținute prin aplicarea altor metode analitice prin raportarea componentelor identificate la unitate de biomasă. O asemenea abordare asigură o estimare obiectivă a efectelor elucidate în cercetările fundamentale din punct de vedere aplicativ, fiind posibilă compararea diferitor producători și calcularea eficienței tehnologiilor elaborate. În procesul de producere aceste metode permit de a realiza controlul în timp real al evoluției culturilor ficologice, aprecierea și pronosticarea rapidă a cantității de produs obținut în cadrul tehnologiilor simple sau integrate.

Calitatea biomasei ficologice este o caracteristică la fel de importantă ca și cantitatea acesteia. De aceea, în această culegere se acordă o atenție aparte metodelor de determinare a componentelor majore și a celor funcționale ale biomasei de cianobacterii și microalge. Protocoalele incluse se referă la grupurile de substanțe de interes științific și biotehnologic, care au o vastă arie

de utilizare în diferite domenii – de la zoo- și fitotehnie la medicina personalizată.

Cianobacteriile și microalgele sunt privite ca surse importante de antioxidanți, producerea acestora pe cale naturală fiind o direcție prioritară a biotehnologiei moderne. În prezenta culegere o atenție deosebită se acordă metodelor de determinare a activității antioxidante și a capacității de implicare a diferitor derivate din biomasa ficologică în procesele de oxido-reducere. Ca și în cazul altor categorii de metode descrise mai sus, acest grup prezintă un interes deosebit atât pentru studenți și cercetători, cât și pentru producători.

Siguranța biomasei ficologice este un criteriu de bază, care determină posibilitatea utilizării acesteia atât în consumul direct, cât și în calitate de materie primă pentru obținerea diferitor produse. În culegerea dată sunt descrise metode care permit monitorizarea acestui parametru important, astfel fiind acoperite toate domeniile de importanță majoră în cercetarea și utilizarea în producere a obiectelor ficologice.

CUPRINS

1.	DETERMINAREA CANTITĂȚII DE BIOMASĂ CIANOBACTERIANĂ ȘI MICROALGALĂ	7
1.1	Metoda de determinare a biomasei cianobacteriei <i>Arthrospira platensis (spirulina)</i>	7
1.2	Metoda de determinare a biomasei cianobacteriei <i>Nostoc linckia</i>	10
1.3	Metoda de determinare a biomasei microalgei verzi <i>Dunaliella salina</i>	14
1.4	Metoda de determinare a biomasei microalgei verzi <i>Haematococcus pluvialis</i>	17
1.5	Metoda de determinare a biomasei microalgei roșii <i>Porphyridium cruentum</i>	22
2.	DETERMINAREA COMPONENTELOR BIOLOGIC ACTIVE ÎN BIOMASA CIANOBACTERIILOR ȘI MICROALGELOR	26
2.1	Determinarea conținutului de proteine	26
2.2	Determinarea conținutului de carbohidrați cu utilizarea reagentului antron	32
2.2.1	Determinarea conținutului de polizaharide sulfatate	36
2.3	Determinarea conținutului de ficobiliproteine	41
2.4	Determinarea conținutului de clorofilă și caroten	43
2.5	Determinarea conținutului de astaxantină	47
2.6	Determinarea conținutului de lipide	50
2.6.1	Metoda spectrofotometrică de determinare a lipidelor	50
2.6.2	Metoda gravimetrică de determinare a conținutului de lipide	55
2.7	Determinarea produselor degradării oxidative a lipidelor, testul TBARS	58
2.8	Determinarea conținutului de fenoli	61

3.	DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI PUTERII DE REDUCERE A BIOMASEI DE CIANOBACTERII ȘI MICROALGE	66
3.1	Determinarea activității antioxidante cu aplicarea radicalului ABTS	66
3.2	Determinarea activității (antioxidante) antiradicalice cu aplicarea radicalului DPPH	72
3.3	Determinarea activității antioxidante prin metoda reducerii reagentului fosfomolibdenic	78
3.4	Metoda reducerii complexului ferocianurii ferice în ferocianură feroasă	82
3.5	Determinarea conținutului peroxidului de hidrogen în biomasa cianobacteriilor și microalgelor prin metoda oxidării iodurii de potasiu cu peroxid de hidrogen	87
3.6	Determinarea capacității de reducere a radicalului oxidului nitric	92
3.7	Determinarea capacității antioxidante cu aplicarea testului TBARS	96
	Bibliografie	99

1. DETERMINAREA CANTITĂȚII DE BIOMASĂ CIANOBACTERIANĂ ȘI MICROALGALĂ

1.1 Metoda de determinare a biomasei cianobacteriei *Arthrospira platensis* (spirulina)

Principiul metodei:

Principiul metodei spectrofotometrice de determinare a conținutului de biomasă în suspensia de spirulină constă în determinarea absorbanței suspensiei colorate și stabile. Stabilitatea suspensiei se obține prin diluții. Metoda a fost propusă în 1993 (Rudic, 1993). În prezent, metoda spectrofotometrică este tot mai frecvent utilizată în aprecierea cantității de biomasă cianobacteriană și microalgală. Metoda este rapidă și eficientă (Michael, 2019; Santos-Ballardo, 2018).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței. Domeniul de măsurare 400 - 750 nm;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, (eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g);
4. Pompă cu vid;
5. Congelator cu temperatura de congelare - 20°C;
6. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
7. Exicator/Desicator;
8. Dulap de uscare. Diapazonul de temperatură de la +50°C până la + 350°C.

Veselă de laborator:

1. Vas din sticlă pentru colectare Kitasato;
2. Pâlnie Buchner conectată la pompa cu vid;
3. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
4. Eprubete din sticlă cu volumul de 10 ml;
5. Cilindru gradat cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,5$ ml;
6. Cilindru gradat cu volumul de 1000 ml cu eroarea absolută $\pm 5,0$ ml;
7. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
8. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Apă distilată;
2. Acetat de amoniu ($C_2H_7NO_2$), chimic pur.

Prepararea reagenților:

Soluția de acetat de amoniu de 1,5%. 1,5 g de $C_2H_7NO_2$ se dizolvă în 50 ml de apă distilată, după care amestecul se trece într-un balon volumetric de 100 ml și se aduce până la cotă cu apă distilată.

Determinarea conținutului de biomasă:

1. Determinarea coeficientului de recalcul al biomasei native de spirulină la biomasa absolut uscată:

La finalizarea unui ciclu de creștere a culturii (ziua 6 - 7), în 10 eprubete din sticlă se introduc câte 10 ml suspensie de spirulină. Pentru fiecare probă de spirulină se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 680 nm. Pentru a evita eroarea măsurării absorbantei se procedează în modul următor: din fiecare probă se extrag eprubete din sticlă câte 1,0 ml de suspensie de spirulină la care se adaugă câte 2,0 ml de apă distilată (se prepară trei repetări) după care se citește absorbanta, care nu va depăși valoarea de 0,3. Apoi, fiecare probă de spirulină se filtrează la instalația de filtrare cu vid, pe un filtru de

hârtie demineralizat, în prealabil uscat la temperatura de $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ până la masă constantă și cântărit. Fiecare probă de biomasă nativă se spală timp de 3 - 5 min cu soluția de acetat de amoniu de 1,5%, pentru a înlătura surplusul de săruri de pe suprafața celulelor de spirulină. Ulterior, filtrele cu biomasă se plasează în dulapul de uscare la temperatura de $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ și se usucă timp de o oră, după care se răcesc până la temperatura camerei și se cântăresc la balanța analitică.

Calculul rezultatelor se face conform formulei: $(B-C)/A_{680} \cdot 100$ g/l, unde: B - greutatea filtrului spălat și uscat; C - 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 absolut uscate de spirulină (BAU) în g, conform formulei: $K=C(g/l)/A_{680}$, unde C masa probei; A_{680} - valoarea absorbantei culturii de spirulină, înregistrată la lungimea de undă de 680 nm.

2. *Standardizarea biomasei de spirulină*: Pentru că în testele biochimice și în procedurile de manipulare tehnologică se utilizează biomasa nativă de spirulină, această biomasă se aduce la o anumită concentrație, numită standard (care se calculează în mg/ml). Etapele de standardizare a biomasei după concentrație sunt următoarele:

a) *Măsurarea volumului și absorbantei suspensiei de spirulină*:

La finalul ciclului de cultivare (ziua 6 - 7) suspensia de spirulină se transferă într-un cilindru gradat și se măsoară volumul acesteia. Apoi, în eprubete din sticlă se introduc câte 1,0 ml de suspensie de spirulină la care se adaugă câte 2,0 ml de apă distilată (se prepară trei repetări). Probele se amestecă și se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 680 nm cu utilizarea aplicației QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, pentru care în formula calculului cantitativ se introduce valoarea coeficientului,

determinat pentru biomasa de spirulină. Absorbanța înregistrată trebuie să fie în limita valorilor de 0,1 - 0,3.

b) *Colectarea și standardizarea după concentrație a biomasei de spirulină:* După citirea absorbantei, volumul măsurat de spirulină se trece prin sistemul de filtrare. Pentru aceasta se montează sistemul de filtrare, care constă din vasul din sticlă pentru colectare Kitasato și pâlnia Buchner, conectat la pompă cu vid. Biomasa de spirulină colectată pe filtrul de hârtie se spală cu soluție de acetat de amoniu de 1,5%, după care se aduce la volumul în care biomasa de spirulină să respecte concentrația de 10 mg/ml. Acest volum se determină după următoarea formulă: $V_2 = A_{680} \cdot K \cdot \eta \cdot V_1 / C$, unde A - absorbanta suspensiei de spirulină la 680 nm; K - coeficientul de recalcul a biomasei native la biomasa de spirulină absolut uscată; η - diluția; V_1 - volumul biomasei după filtrare, ml; V_2 - volumul la care se aduce proba de spirulină cu apă la concentrația finală de 10 mg/ml; C - concentrația la care se standardizează biomasa (în cazul dat 10 mg/ml). Se obține proba de spirulină standardizată la concentrația de 10 mg/ml.

3. *Prepararea biomasei de spirulină pentru testele biochimice:*

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

1.2 Metoda de determinare a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;

3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
5. Congelator cu temperatura de congelare - 20°C;
6. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono-canal cu volumul fixat sau variabil;
7. Exicator/Desicator;
8. Dulap de uscare. Diapazonul de temperatură + 50°C până la + 350°C.

Veselă de laborator:

1. Eprubete din plastic gradate pentru centrifugare cu volumul de 10 ml;
2. Cilindru gradat cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,5$ ml;
3. Cilindru gradat cu volumul de 1000 ml cu eroarea absolută $\pm 5,0$ ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Creuzetă din porțelan.
6. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Apă distilată;
2. Acetat de amoniu ($C_2H_7NO_2$), chimic pur.

Prepararea reagenților:

Soluția de acetat de amoniu de 2,5%. Cantitatea de 2,5 g de $C_2H_7NO_2$ se dizolvă în 50 ml de apă distilată, după care amestecul se trece într-un balon volumetric de 100 ml și se aduce până la cotă cu apă distilată.

Determinarea conținutului de biomasă:

1. Determinarea coeficientului de recalcul al biomasei native de nostoc la biomasa absolut uscată:

La finalizarea unui ciclu vital de creștere al nostocului (ziua a 12-a), în 10 eprubete pentru centrifugare se introduc câte 10 ml suspensie de nostoc. Pentru fiecare probă de nostoc se înregistrează (în 3 repetări) absorbanta la lungimea de undă de 590 nm. Pentru a evita eroarea măsurării absorbantei, din fiecare probă se extrag în alte eprubete câte 1,0 ml de suspensie de nostoc la care se adaugă câte 2,0 ml de apă distilată (se prepară trei repetări), după care se citește absorbanta, care nu va depăși valoarea de 0,3 unități. Apoi, eprubetele cu cultura de nostoc se plasează în centrifugă și se centrifughează la 2200 rpm timp de 15 min. După supernatantul - lichidul cultural se înlătură, iar biomasa nativă se spală repetat cu soluția de acetat de amoniu de 2,5%, pentru a înlătura surplusul de săruri de pe suprafața celulelor de nostoc. Apoi, biomasa se trece cantitativ cu soluția de acetat de amoniu de 2,5% (5 ml) în creuzete din porțelan în prealabil uscate la temperatura de $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$, răcite până la temperatura camerei și cântărite la balanța analitică. Creuzetele cu biomasa de nostoc se usucă în dulapul de uscare la aceeași temperatură până la masă constantă, se răcesc până la temperatura camerei și se cântăresc la balanța analitică.

Calculul rezultatelor se face conform formulei: $(B-C)/A_{590} \cdot 100 \text{ g/l}$, unde: B - greutatea creuzetei; C - greutatea creuzetei cu biomasă uscată și răcită până la temperatura camerei; A_{590} - absorbanta suspensiei de nostoc la 590 nm; 100 - coeficientul de recalculare pentru 1,0 l suspensie. Se calculează coeficientul corelării valorilor absorbantei la valorile masei absolut uscate de nostoc (g) conform formulei: $K=C(\text{g/l})/A_{590}$, unde C masa probei; A_{590} - valoarea absorbantei înregistrate la 590 nm.

2. Standardizarea biomasei de nostoc:

a) *Măsurarea volumului și absorbantei suspensiei de nostoc:* La finalizarea ciclului de cultivare (a 12-a zi), suspensia de nostoc se transferă într-un cilindru gradat și se măsoară volumul acesteia. Apoi, în eprubete din sticlă (sau din plastic pentru centrifugare) se introduc câte 1,0 ml de suspensie

de nostoc la care se adaugă câte 2,0 ml de apă distilată (se prepară trei repetări). Probele se amestecă și se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 590 nm cu utilizarea aplicației QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului pentru care, în formula calculului cantitativ se introduce valoarea coeficientului, determinat pentru biomasa cianobacteriană. Limita de valori pentru absorbanta înregistrată trebuie să fie între 0,1 - 0,3.

c) *Colectarea și standardizarea după concentrație a biomasei de nostoc:* Volumul suspensiei de nostoc se centrifughează la 2200 rpm timp de 15 min. Biomasa se separă de supernatant, după care se amestecă cu apă distilată în cantitatea care corespunde volumului suspensiei cu concentrația de 10 mg/ml, calculat pentru fiecare probă. Volumul suspensiei până la care trebuie adusă biomasa de nostoc pentru a obține concentrația de 10 mg/ml se determină după următoarea formulă: $V_2 = A_{590} \cdot K \cdot \eta \cdot V_1 / C$, unde A_{590} - absorbanta suspensiei de nostoc; K - coeficientul de recalcul al biomasei native la biomasa de nostoc absolut uscată; η - diluția; V_1 - volumul biomasei după filtrare, ml; V_2 - volumul la care se aduce proba de nostoc cu apă la concentrația finală de 10 mg/ml; C - concentrația la care se standardizează biomasa (în cazul dat 10 mg/ml). Se obține proba de nostoc standardizată la concentrația de 10 mg/ml.

3. *Prepararea biomasei de nostoc pentru teste biochimice*

Pentru a asigura distrugerea membranei celulare a cianobacteriei și accesibilitatea conținutului de masă celulară a nostocului, biomasa se congelează timp de 24 ore la temperatura de la minus 10 până la minus 30°C. La expirarea timpului de expunere congelării, biomasa se plasează la temperatura camerei pentru o durată de timp în care se dezgheață complet. Apoi, biomasa se agită bine, și se supune procedurii de congelare - decongelare încă de cel puțin 5 ori.

1.3 Metoda de determinare a biomasei microalgei verzi *Dunaliella salina*

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
5. Congelator cu temperatura de congelare 18 - 20⁰C;
6. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
7. Exicator/Desicator;
8. Dulap de uscare. Diapazonul de temperatură + 50⁰C până la + 350⁰C.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare cu volumul de 10 ml;
3. Creuzete din porțelan;
4. Cilindru gradat cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,5$ ml;
5. Cilindru gradat cu volumul de 1000 ml cu eroarea absolută $\pm 5,0$ ml;
6. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
7. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Apă distilată;
2. Acetat de amoniu ($C_2H_7NO_2$), chimic pur;
3. Clorură de sodiu (NaCl), chimic pur;
4. Bicarbonat de amoniu ($(NH_4)_2CO_3$), chimic pur.

Prepararea reagenților:

- 1. Soluția de acetat de amoniu de 2,0%.** 2,0 g $C_2H_7NO_2$ 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.
- 2. Soluția de clorură de sodiu de 3,0%.** 3,0 g NaCl 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.
- 3. Soluția de bicarbonat de amoniu de 25,0%.** 25 g $(NH_4)_2CO_3$ 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 conținutului de biomasă:

1. *Determinarea coeficientului de recalcul al biomasei native de dunalielă la biomasa absolut uscată:*

La finalizarea unui ciclu de creștere a culturii (a 10-a zi), în 10 eprubete de centrifugare se introduc câte 10 ml suspensie de dunalielă. Pentru fiecare probă de dunalielă se înregistrează (în 3 repetări) absorbanta la lungimea de undă de 680 nm în diluția care să asigure un nivel al valorilor absorbantei între 0,1 și 0,3. Probele se centrifughează la 2200 rpm timp de 6 min. Biomasa nativă se spală timp de 3 - 5 min cu soluția de clorură de sodiu de 3%, pentru a înlătura urmele de cationi bivalenți (Ca^{2+} , Md^{2+} , Fe^{2+}), după care biomasa se spală cu soluție saturată de bicarbonat de amoniu pentru înlăturarea clorurii de sodiu. Apoi, biomasa se spală (de 3 - 5 ori) cu soluția de acetat de amoniu de 2,0 %. Folosirea soluției saturate de bicarbonat de amoniu și de acetat de amoniu în scopul înlăturării sărurilor asigură integritatea membranelor celulelor, care în caz de utilizare a apei distilate sunt supuse lizării în rezultatul stresului hiposmotic. Aceasta permite de a evita pierderile de biomasă și asigură un nivel înalt de precizie a metodei.

Biomasa de dunalielă se trece cantitativ cu soluția de acetat de amoniu de 2,0 % (5ml) în creozete din porțelan (în prealabil uscate până la masă constantă și cântărite), care se usucă la temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ până la masă constantă, după care se răcesc până la temperatura camerei, se cântăresc la balanța analitică.

Calculul rezultatelor se face conform formulei: $(B-C)/A_{680} \cdot 100 \text{ g/l}$, unde B - greutatea creozetei de porțelan cu biomasă; C - greutatea creozetei de porțelan cu biomasă uscată și răcită până la temperatura camerei; A_{680} - absorbanta suspensiei de dunalielă la lungimea de undă 680 nm; 100 - coeficientul de recalculare pentru 1,0 l suspensie dunalielă. Se calculează coeficientul corelării valorilor absorbantei la valorile masei de dunalielă (g) conform formulei: $K=C(\text{g/l})/A_{680}$, unde C masa probei; A_{680} - valoarea absorbantei înregistrate la lungimea de undă 680 nm.

2. Standardizarea biomasei de dunalielă:

a) *Măsurarea volumului și absorbantei suspensiei de dunalielă:* La finalizarea ciclului de cultivare (a 10-a zi), suspensia de dunalielă se transferă într-un cilindru gradat și se măsoară volumul acesteia. Apoi, în eprubete din sticlă (sau din plastic pentru centrifugare) se extrage câte 1,0 ml suspensie biomasă la care se adaugă câte 2,0 ml apă distilată pentru asigurarea unui nivel al valorilor absorbantei între 0,1 și 0,3. Se prepară trei repetări pentru fiecare probă. Se înregistrează absorbanta la lungimea de undă 680 nm. Poate fi utilizată aplicația **QUANTITATIVE WORKSPACE** din dotarea spectrofotometrului, pentru care în formula calculului cantitativ se introduce valoarea coeficientului, determinat pentru biomasa de dunalielă.

b) *Colectarea și standardizarea după concentrație a biomasei de dunalielă:* Volumul suspensiei microalgale se centrifughează la 2200 rpm timp de 6 min. Biomasa nativă se spală timp de 3 - 5 min cu soluție de clorură de sodiu de 3%, urmată de procedura de spălare cu soluție saturată de bicarbonat de amoniu și cu soluție de acetat de amoniu de 2% (de 3 - 5 ori).

Biomasa se spală din eprubetă cu apă distilată în cantitatea care corespunde volumului suspensiei cu concentrația de 10 mg/ml calculat pentru fiecare probă.

Volumul suspensiei până la care trebuie adusă biomasa microalgală la concentrația de 10 mg/ml se determină după următoarea formulă: $V_2 = A \cdot K \cdot \eta \cdot V_1 / C$, unde A_{680} - absorbanta suspensiei de dunalielă; K - coeficientul de recalculare al biomasei native la biomasa absolut uscată de dunalielă; η - diluția; V_1 - volumul biomasei după centrifugare, ml; V_2 - volumul la care se aduce proba cu apă la concentrația finală de 10 mg/ml. Se obține proba de dunalielă standardizată după concentrația biomasei de 10 mg/ml.

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

1.4 Metoda de determinare a biomasei microalgei verzi *Haematococcus pluvialis*

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
5. Congelator cu temperatura de congelare - 20°C;

6. Pipete de sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
7. Exicator/Desicator;
8. Dulap de uscare. Diapazonul de temperatură + 50⁰C până la + 350⁰C.

Veselă de laborator:

1. Eprubete din plastic gradate pentru centrifugare cu volumul de 10 ml;
2. Cilindru gradat cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută \pm 0,5 ml;
3. Cilindru gradat cu volumul de 1000 ml cu eroarea absolută \pm 5,0 ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Creuzetă din porțelan;
6. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Apă distilată;
2. Acetat de amoniu ($C_2H_7NO_2$) chimic pur.

Prepararea reagenților:

Soluția de acetat de amoniu 2,5%. 2,5 g $C_2H_7NO_2$ 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 conținutului de biomasă:

1. *Determinarea coeficientului de recalcul al biomasei native de hematococ la biomasa absolut uscată:*

În 10 eprubete de centrifugare se introduc câte 10 ml suspensie de biomasă de hematococ, *faza mobilă (verde)*. Pentru fiecare probă de hematococ se înregistrează (în 3 repetări) absorbanta la lungimea de undă de 680 nm în diluția care să asigure un nivel al valorilor absorbantei între 0,1 și 0,3. Probele se centrifughează la 2200 rpm timp de 10 min. Biomasa nativă se spală de 3

ori cu soluția de acetat de amoniu de 2,5%. După, biomasa de hematococ se trece cantitativ cu soluția de acetat de amoniu de 2,5% (5ml) în creozete (în prealabil uscate și cântărite), care se plasează în dulapul de uscare și se usucă la temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ până la masă constantă. Probele se răcesc până la temperatura camerei și se cântăresc la balanța analitică.

Calculul rezultatelor se face conform formulei: $(B-C)/A_{680} \cdot 100$ g/l, unde B - greutatea creozetei din porțelan cu biomasa microalgală; C - greutatea creozetei din porțelan cu biomasa uscată și răcită până la temperatura camerei; A - absorbanta suspensiei de hematococ la 680 nm; 100 - coeficientul de recalcul pentru 1 l suspensie microalgală. Se calculează coeficientul corelării valorilor absorbantei la valorile masei de hematococ, faza verde (g) conform formulei: $K=C(\text{g/l})/A_{680}$, unde C - masa probei; A_{680} - valoarea absorbantei înregistrate la 680 nm.

3. Colectarea, standardizarea după concentrație și prepararea pentru testele biochimice a biomasei de hematococ, faza verde:

Suspensia de hematococ obținută la finalul fazei mobile se măsoară pentru a stabili volumul acesteia. Din fiecare vas cu suspensia de microalgă se prepară probele pentru înregistrarea absorbantei. În eprubete din sticlă se extrage câte 1,0 ml de suspensie de biomasă la care se adaugă câte 2,0 ml de apă distilată pentru asigurarea unui nivel al valorilor absorbantei între 0,1 și 0,3. Se prepară trei repetări pentru fiecare probă. Se înregistrează absorbanta la lungimea de undă 680 nm. Poate fi utilizată aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, pentru care în formula de calcul cantitativ se introduce valoarea coeficientului, determinat pentru biomasa de hematococ.

Volumul suspensiei microalgale se centrifughează la 2200 rpm timp de 10 min. Biomasa nativă se spală cu soluție de acetat de amoniu 1,5%. Biomasa se spală din eprubetă cu apă distilată în cantitatea care corespunde volumului suspensiei cu concentrația de 10 mg/ml calculat pentru fiecare probă. Volumul

suspensiei până la care trebuie adusă biomasa microalgală la concentrația de 10 mg/ml se determină după următoarea formulă: $V_2 = A_{680} \cdot K \cdot \eta \cdot V_1 / C$, unde A_{680} - absorbanta suspensiei de hematococ; K - coeficientul de recalculare a biomasei native de hematococ la biomasa absolut uscată; η - diluția; V_1 - volumul biomasei după centrifugare, ml; V_2 - volumul la care se aduce proba cu apă la concentrația finală de 10 mg/ml. Se obține proba de hematococ, faza mobilă, standardizată la concentrația de 10 mg/ml.

Biomasa microalgală, pentru analize biochimice, se colectează într-un vas din plastic și se supune procedurii de congelare - decongelare cel puțin de 6 ori în scopul distrugerii peretelui celular.

Determinarea conținutului de biomasă, faza ciști bruni, faza ciști roșii:

1. Determinarea coeficientului de recalcul al biomasei native de hematococ la biomasa absolut uscată:

În 10 eprubete de centrifugare se introduc câte 10 ml suspensie de biomasă de hematococ în stadiul palmeloid (ciști bruni) sau cel de aplanospor (ciști roșii). Pentru fiecare probă de hematococ se înregistrează (în 3 repetări) absorbanta la lungimea de undă respectivă în diluția care să asigure un nivel al valorilor absorbantei între 0,1 și 0,3. Lungimea de undă pentru faza brună este de 480 nm și de 565 nm pentru faza de aplanospori. Se va evita sedimentarea biomasei. Probele cu cultură microalgală se centrifughează la 2200 rpm timp de 5 min. Biomasa nativă se spală de 3 ori cu apă distilată. Ulterior, biomasa de hematococ se trece cantitativ cu o cantitate (5 ml) de apă distilată în creozete (în prealabil uscate și cântărite), se plasează în dulapul de uscare și se usucă la temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ până la masă constantă, după care se răcesc până la temperatura camerei se cântăresc la balanța analitică.

Calculul rezultatelor se face conform formulei: $(B-C)/A \cdot 100$ g/l, unde B - greutatea creozetei din porțelan cu biomasa microalgală; C - greutatea creozetei din porțelan cu biomasa uscată și răcită până la temperatura camerei;

A - absorbanta suspensiei de hematococ la 480 nm pentru faza brună și 545 nm pentru faza roșie; 100 - coeficientul de recalcul pentru 1,0 l de suspensie microalgă. Se calculează coeficientul corelării valorilor absorbantei la valorile masei de hematococ faza brună sau faza roșie (g) conform formulei: $K=C(g/l)/A$, unde C - masa probei; A - valoarea absorbantei, înregistrată la lungimile de undă specifică fazei ciclului de dezvoltare al microalgei.

2. *Colectarea, standardizarea după concentrație și prepararea pentru testele biochimice a biomasei de hematococ, faza ciști bruni, ciști roșii:* Suspensia de hematococ obținută la finalul fazei în studiu se măsoară pentru a stabili volumul acesteia. Din fiecare vas cu suspensia microalgă se prepară probele pentru înregistrarea absorbantei. În eprubete din sticlă se extrag câte 1,0 ml de suspensie de biomasă la care se adaugă câte 2,0 ml de apă distilată. Se prepară trei repetări pentru fiecare probă. Se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 480 nm pentru cultura de hematococ colectată în faza ciști bruni sau 565 nm pentru faza ciști roșii (intervalul de valori măsurate va fi între 0,1 și 0,3). Poate fi utilizată aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, pentru care în formula calculului cantitativ se introduce valoarea coeficientului, determinat pentru biomasa de hematococ.

Volumul suspensiei microalgale se centrifughează la 2200 rpm timp de 5 min. Biomasa nativă se spală cu apă distilată. Biomasa se trece din eprubetă cu apă distilată în cantitatea care corespunde volumului suspensiei cu concentrația de 10 mg/ml calculat pentru fiecare probă. Volumul suspensiei până la care trebuie adusă biomasa microalgă la concentrația de 10 mg/ml se determină după următoarea formulă: $V_2=A \cdot K \cdot \eta \cdot V_1/C$, unde A - absorbanta suspensiei de hematococ pentru faza de ciști în studiu; K - coeficientul de recalculare al biomasei native de hematococ la biomasa absolut uscată ; η - diluția; V_1 - volumul biomasei după centrifugare, ml; V_2 - volumul la care se aduce proba cu apă la concentrația finală de 10 mg/ml. Se obține proba de

hematococ, faza brună sau faza roșie, standardizată la concentrația de 10 mg/ml.

Biomasa standardizată de hematococ, ciști bruni sau aplanospori (10 mg/ml), se centrifugează timp de 5 min la 2200 rpm. La probele de biomasă, rezultate după centrifugare, se adaugă a câte 1,0 ml soluție de acid clorhidric de 0,1M. Suspensia obținută se supune incubării pe baia de apă la temperatura de 90°C timp de 10 min. Probele se răcesc sub jet de apă rece. Acidul se înlătură prin decantare. Biomasa supusă hidrolizei se spală cu apă distilată. Pentru aceasta în eprubetele cu biomasa supusă hidrolizei se adaugă 6 - 7 ml de apă distilată. Eprubeta se agită, iar apa se elimină prin decantare (ciștii rămân în sediment). Procedura se repetă de trei ori. După a treia spălare, biomasa se separă prin centrifugare la 2400 rpm timp de 3 min. Biomasa poate fi utilizată în continuare pentru testele biochimice.

1.5 Metoda de determinare a biomasei microalgei roșii *Porphyridium cruentum*

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
5. Congelator cu temperatura de congelare - 20°C;
6. Pipete de sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
7. Exicator/Desicator;
8. Dulap de uscare. Diapazonul de temperatură + 50°C până la + 350°C.

Veselă de laborator:

1. Eprubete din plastic gradate pentru centrifugare cu volumul de 10 ml;
2. Cilindru gradat cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,5$ ml;
3. Cilindru gradat cu volumul de 1000 ml cu eroarea absolută $\pm 5,0$ ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Creuzetă din porțelan;
6. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Apă distilată;
2. Acetat de amoniu ($C_2H_7NO_2$), chimic pur.

Prepararea reagenților:

Soluția de acetat de amoniu de 2,0%. Cantitatea de 2,0 g $C_2H_7NO_2$ se dizolvă în 50 ml de apă distilată, după care amestecul se trece într-un balon volumetric de 100 ml și se aduce până la cotă cu apă distilată.

Determinarea conținutului de biomasă:

1. Determinarea coeficientului de recalcul al biomasei native de porfiridium la biomasa absolut uscată:

În 10 eprubete pentru centrifugare se introduc câte 10 ml suspensie de porfiridium (vârsta culturii - 14 zile). Pentru fiecare probă de porfiridium se înregistrează (în 3 repetări) absorbanta la lungimea de undă de 545 nm în diluția, care să asigure un nivel al valorilor absorbantei între 0,1 și 0,3. Probele se centrifughează la 2200 rpm timp de 10 min. Biomasa nativă se spală de 3 ori cu soluție de acetat de amoniu de 2,0% pentru a înlătura surplusul de săruri de pe suprafața celulelor. Apoi biomasa de porfiridium se trece cantitativ, cu o cantitate (5ml) de soluție de acetat de amoniu de 2,0%, în creozete (în prealabil uscate și cântărite), care se plasează în dulapul de uscare și se usucă

la temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ până la masă constantă, după ce se răcesc până la temperatura camerei și se cântăresc la balanța analitică.

2. *Calcularea rezultatelor se face conform formulei:* $(B-C)/A_{545} \cdot 100$ g/l, unde B - greutatea creuzetei; C - greutatea creuzetei cu biomasă uscată și răcită până la temperatura camerei; A_{545} - absorbanta suspensiei de porfiridium la 545 nm; 100 - coeficientul de recalcul pentru 1,0 l de suspensie microalgală. Se calculează coeficientul corelării valorilor absorbantei la valorile masei de porfiridium (g) conform formulei: $K=C(\text{g/l})/A_{545}$, unde C - masa probei; A_{545} – valoarea absorbantei înregistrată la 545 nm.

2. *Colectarea, standardizarea după concentrație și prepararea pentru testele biochimice a biomasei de porfiridium.* Suspensia de porfiridium, obținută în rezultatul experiențelor, se măsoară pentru a stabili volumul. Din fiecare vas cu suspensia de porfiridium se prepară probele pentru înregistrarea absorbantei. În eprubete de sticlă se iau a câte 1,0 ml suspensie de biomasă la care se adaugă 2,0 ml apă distilată. Se prepară trei repetări pentru fiecare probă. Se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 545 nm cu utilizarea aplicației QUANTITATIVE WORKSPACE din dotația spectrofotometrului, pentru care în formula calculului cantitativ se introduce valoarea coeficientului determinat pentru biomasa microalgală.

Volumul suspensiei de porfiridium se centrifughează la 2200 rpm timp de 10 min. Biomasa se separă de supernatant și se spală cu apă distilată în cantitatea care corespunde volumului suspensiei cu concentrația de 10 mg/ml calculat pentru fiecare probă.

Volumul suspensiei până la care trebuie adusă biomasa de porfiridium la concentrația de 10 mg/ml se determină după următoarea formulă: $V_2=A_{545} \cdot K \cdot \eta \cdot V_1/C$, unde A_{545} - absorbanta suspensiei de porfiridium; K - coeficientul de recalculare al biomasei de porfiridium la biomasa absolut uscată; η - diluția; V_1 - volumul biomasei după filtrare, ml; V_2 - volumul la care se aduce proba cu apă la concentrația finală de 10 mg/ml. Se obține proba

de porfiridium standardizată la concentrația biomasei de 10 mg/ml.

Pentru a asigura distrugerea peretelui celular al porfiridiumului și accesibilitatea conținutului de masă celulară, biomasa se congelează timp de 24 ore la temperatura de la minus 10 până la minus 30⁰C. La expirarea timpului de expunere congelării, biomasa se plasează la temperatura camerei pentru o durată de timp în care biomasa se dezgheață complet. După, biomasa se agită bine, și se supune procedurii de congelare - decongelare de cel puțin 5 ori. Biomasa prelucrată se utilizează pentru efectuarea testelor biochimice.

2. DETERMINAREA COMPONENTELOR BIOLOGIC ACTIVE ÎN BIOMASA CIANOBACTERIILOR ȘI MICROALGELOR

2.1 Determinarea conținutului de proteine

Principiul metodei:

Se utilizează Metoda Lowry, care are la bază două reacții diferite. 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 fosfomolibdenic cu fenol) formând un produs instabil, care se transformă în albastru de molibden cu o absorbție 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. 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 (Gornall, 1949). A doua reacție este reducerea reactivului Folin - Ciocalteu de către complexul cuprului redus (obținut în prima reacție) cu legături amidice, precum și cu reziduuri de aminoacizii tirozina și triptofanul. Reactivul Folin - Ciocalteu în formă redusă are o culoare albastră (violet), prin urmare, este detectat spectrofotometric. Conform intensității culorii soluției se determină concentrația proteinelor (Lowry, 1951). Sensibilitatea metodei este de 2 $\mu\text{g/ml}$. Limitele concentrațiilor determinate sunt de la 5 la 500 $\mu\text{g/ml}$.

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței. Domeniul de măsurare 400 - 750 nm. Principiul spectrofotometriei VIS se bazează pe legea Lambert - Beer (Marczenko, 2000). Această lege prevede, că cantitatea de lumină absorbită de către o soluție colorată este expresia unei funcții

exponențiale a concentrației și a lungimii de undă în raport cu acea soluție. Calibrarea metodei pentru o anumită substanță implică două etape distincte:

a) Se determină maximul de absorbție al substanței respective efectuând un scanning al lungimilor de undă în concordanță cu culoarea acesteia;

b) Se determină relația dintre concentrația substanței luată pentru analiză (sau a produsului rezultat, dacă este vorba de o reacție de culoare) și absorbție. Această determinare se face la lungimea de undă ce corespunde maximului de absorbție, determinat la prima etapă.

1. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
2. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
3. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
4. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 500 g, eroarea de măsurare $\pm 0,001$ g;
5. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
6. Vortex mixer de laborator.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 50 ml cu eroarea absolută $\pm 0,05$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml cu capace;
3. Cilindru gradat cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,5$ ml;
4. Cilindru gradat cu volumul de 20 ml cu eroarea absolută $\pm 0,2$ ml;
5. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
6. Baghetă din sticlă.

Pregătirea vaselor:

Toate vasele se spală bine cu o perie moale cu bicarbonat de sodiu și se clătesc cu apă distilată. Vasele sunt uscate într-un dulap de uscare. În lucru se folosesc numai vase uscate.

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 utilizat tartratul 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. Reagent Folin - Ciocalteu 2N, Merck. Reactivul fenol generează cromogeni care dau absorbantă maximală între 550 - 750nm. În mod normal, absorbanta la 750 nm sau la 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 concentrațiile mai mari de proteine;
6. Albumină serică bovină, grad puritate $\geq 99,8\%$;
7. Apă distilată;
8. Alcool etilic de 96% pentru prelucrarea cuvelor.

Prepararea reagenților:

1. Reagentul A:

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

Se prepară soluția de carbonat de sodiu de 2%. Pentru aceasta 2 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.

2. Reagentul B:

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

3. Reagentul C:

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

4. Reagentul D:

Se prepară soluția 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.

5. Soluția stoc de albumină serică bovină:

Se cântăresc 25 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 0,1N hidroxid de sodiu.

Comentariu. Nu este necesar să se prepare proba exact din 25 mg. Concentrația soluției stoc poate fi diferită, dar de preferință aproape de 500 μg/ml. De obicei, concentrația soluției inițiale este selectată în dependență de materialul cântărit și conținutul de proteine în materialul biologic luat pentru analiză.

Prepararea reagentului Folin - Ciocalteu: Se cântăresc 10 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (recristalizat) și 2,5 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Reagenții se trec într-un balon cu fund rotund de 200 - 250 ml, se adaugă 70 ml apă distilată și se amestecă bine. La soluția rezultată se adaugă 5 ml de soluție de acid fosforic de 85% și 10 ml de HCl concentrat. Balonul este conectat la un condensator cu reflux pentru 10 ore. La soluția rezultată se adaugă 15 g de Li_2SO_4 , 5 ml de apă cu o picătură de brom. Soluția obținută se agită și se încălzește timp de 5

min pentru a îndepărta bromul. Procedura decurge în condiții de ventilare. După răcire amestecul se completează până la 100 ml cu apă, se filtrează și se diluează de două ori cu apă distilată, astfel încât să se obțină o soluție de acid 1N. Reactivul se păstrează într-un vas din sticlă întunecată mai mult timp.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic al rezultatului privind conținutul de proteine din eșantion, se efectuează 3 măsurări. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru hidroliza alcalină și 3 eprubete pentru reacția directă pentru proteine. În plus, sunt necesare trei eprubete pentru proba control sau oarbă. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Pregătirea probelor pentru hidroliza alcalină.* Biomasa standardizată (10 mg/ml) este supusă procedurii de congelare - decongelare cel puțin de 6 ori pentru a distruge peretele celular. Din fiecare probă, pentru analiză (în trei eprubete), se colectează câte 0,1 ml biomasă.

3. *Hidroliza alcalină.* La fiecare dintre eprubetele numerotate cu biomasa deja turnată se adaugă 0,9 ml soluție de NaOH 0,1N, se amestecă pe un agitator și se lasă pentru 30 min la temperatura camerei.

Determinarea conținutului de proteine:

1. *Reacția Biuret + reactivul Folin - Chocalteu.* După expirarea a 30 min, din hidrolizatul alcalin se iau 0,2 ml și se introduc într-o eprubetă pentru reacția directă la proteină. La volumul de 0,2 ml hidrolizat se adaugă 0,8 ml apă distilată. Volumul de lucru este de 1 ml la care se adaugă 1,5 ml soluție C. Amestecul obținut se agită și este expus pentru 10 min la temperatura camerei. După expirarea a 10 min se adaugă 0,5 ml soluție D. Amestecul obținut se agită intens cu ajutorul unui vortex după care se expune pentru 45 - 50 min la întuneric la temperatura camerei. După expirarea timpului se

măsoară absorbanta probelor la lungimea de undă de 750 nm față de proba oarbă.

2. *Proba oarbă.* La 1 ml apă distilată se toarnă 1,5 ml reactiv C, amestecul se agită, după 10 min de expunere la temperatura camerei se adaugă 0,5 ml reactiv D și se agită energic. După 45 - 50 de min de expunere în condiții identice probelor, această probă este utilizată ca referință la măsurarea probelor care conțin proteine.

3. *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 ml soluție rezultată se adaugă 1,5 ml soluție C, se agită și după 10 min de expunere la temperatura camerei se adaugă 0,5 ml 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 în raport cu proba oarbă. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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 $K=C/E_{750}$, unde C este concentrația proteinei mg/ml, E - absorbanta probei la 750 nm. Curba de calibrare se construiește la fiecare determinare sau o dată la trei luni.

4. *Calculul conținutului cantitativ de proteine în probe se efectuează:*

a) În baza coeficientului determinat din curba de calibrare, se aplică formula de calcul: $C = A_{750} \cdot K \cdot \eta \cdot 100/m$, unde C – conținutul de proteină în biomasă (%); A_{750} - absorbanta la 750 nm; K - coeficientul de recalcul (în mg proteină/ml probă) determinat din curba de calibrare; η - diluția; 100 - coeficientul de trecere la %; m - masa probei pentru analiză, mg. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația

PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

b) Absorbanța probelor experimentale se poate înregistra, utilizând aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile conținutului de proteine în probe. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

2.2 Determinarea conținutului de glucide cu utilizarea reagentului antron

Principiul metodei:

Metoda are la bază descompunerea carbohidraților în monozaharide într-un mediu puternic acid, urmată de deshidratarea lor și formarea de hidroximetilfurfural, care formează în reacția cu reagentul antron (9(10H)-antracenonă, $C_{14}H_{10}O$) un compus complex verde - albastrui. Dependența corelațională a intensității culorii de conținutul de glucide din proba analizată este observată în intervalul concentrației de monozaharide 0,02 - 0,10 mg/ml. (Hedge, 1962). Metoda este utilizată în algologie (Fiset, 2017).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței. Domeniul de măsurare 400 - 750 nm;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Balanță analitică, cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
4. Balanță analitică, cu limita maximală de cântărire 500 g, eroarea de măsurare $\pm 0,001$ g;

5. Baie de apă;
6. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
7. Vortex mixer de laborator;

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 50 ml cu eroarea absolută $\pm 0,05$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml. Pentru a exclude evaporarea apei din eprubetă în timpul hidrolizei, se folosesc capace speciale pentru procesul de fierbere;
3. Cilindru gradat cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,5$ ml;
4. Cilindru gradat cu volumul de 20 ml cu eroarea absolută $\pm 0,2$ ml;
5. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
6. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

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

Prepararea reagenților:

1. **Reagentul Antron:** 50 mg antron se dizolvă în 100 ml acid sulfuric de 66%. Soluția obținută se expune la întuneric pentru 4 ore.
2. **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 este adus la cotă.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru veridicitatea statistică a rezultatului privind conținutul de glucide din eșantion, se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru hidroliza acidă și 3 eprubete pentru proba control. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Pregătirea probelor pentru hidroliza acidă.* Biomasa standardizată (10 mg/ml) este supusă procedurii de congelare - decongelare cel puțin de 6 ori pentru a distruge peretele celular. Biomasa supusă analizei este diluată de 10 ori. Din fiecare probă se colectează volumul de 0,2 ml biomasă care este introdus în eprubetă (trei eprubete).

Determinarea conținutului de glucide:

1. *Pregătirea probelor experimentale.* La 0,2 ml biomasă diluată de 10 ori se adaugă cu precauție 2,0 ml de reagent antron. Procedura se efectuează foarte precaut 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 100⁰C 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 expunere, se înregistrează absorbanta probelor la lungimea de undă de 620 nm în raport cu proba oarbă.

2. *Pregătirea probei oarbe.* Se amestecă 0,2 ml apă distilată cu 2,0 ml reagent antron. Procedura se efectuează foarte precaut pe gheață. Amestecul se expune la temperatura camerei pentru 10 min. Proba obținută în așa fel se plasează pe baia de apă la 100⁰C timp de 10 min. După, proba se răcește sub apă curentă rece și se expune la întuneric, la temperatura camerei pentru 30 min. După expunere proba este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

3. *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 1 ml cu apă distilată. Din fiecare probă de glucoză se iau 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 se expun la fierbere pe baia de apă la 100⁰C pentru 10 min. După hidroliză și răcirea probelor până la temperatura camerei, se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 620 nm în raport cu proba oarbă.

Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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 $K=C/A_{620}$, unde C - concentrația glucozei în probe, mg/ml, A - absorbanta probei la 620 nm. Curba de calibrare se construiește de fiecare dată când sunt preparați reagenții.

4. *Calculul conținutului cantitativ de glucide în probe se efectuează:*

a) În baza coeficientului determinat experimental, se aplică formula de calcul: $C=A_{620} \cdot K \cdot \eta \cdot 100/m$, unde C - conținutul de glucide în biomasă (%); A_{620} - absorbanta la 620 nm; K - coeficientul de recalcul (în mg glucide/ml probă) determinat din curba de calibrare; η - diluția; 100 - coeficientul de trecere la %; m - masa probei pentru analiză, mg. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

b) Absorbanta probelor experimentale se poate înregistra și cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile conținutului de glucide în probe. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

2.2.1 Determinarea conținutului de polizaharide sulfatate

Principiul metodei:

Metoda este bazată pe legarea grupărilor anionice carboxil și grupărilor ester sulfatate a polizaharidelor acide algale cu colorantul alcian - blue și formarea unui precipitat insolubil (Pasow, 1995; Ramus, 1977). Se determină diferența dintre absorbanta colorantului la 610 nm (proba oarbă) și absorbanta colorantului rămas în soluție după precipitare care este proporțională cu conținutul de polizaharide în probă. La valoarea pH-ului 2,5 are loc legarea colorantului albastru alcian cu toate grupările anionice (carboxil și grupărilor ester sulfatate) a polizaharidelor acide algale, iar la pH-ul 1,0 - 1,5 colorantul se leagă doar cu polizaharidele sulfatate (Bulimaga, 2010).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei. Domeniul de măsurare 400 - 750 nm;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Balanță analitică, cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
6. Balanță analitică, cu limita maximală de cântărire 500 g, eroarea de măsurare $\pm 0,001$ g;
7. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
8. Agitator orbital.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,1$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml;

3. Eprubete Eppendorf din plastic cu volumul de 2 ml
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Acid acetic (CH_3COOH) concentrat, chimic pur;
2. Albastru alcian ($\text{C}_{58}\text{H}_{68}\text{Cl}_4\text{CuN}_{16}\text{S}_4$), grad puritate $\geq 98\%$;
3. Clorură de calciu (CaCl_2), chimic pur;
4. Alcool etilic de 96%;
5. Acid clorhidric (HCl) concentrat de 37%, densitatea $1,19 \text{ g/cm}^3$, chimic pur;
6. Caragenan, produs din alge.

Prepararea reagenților:

1. **Soluția de acid acetic de 7%.** Se măsoară cu pipeta 7 ml CH_3COOH concentrat, se trec cantitativ într-un balon cotat de 100 ml și se aduce volumul cu apă distilată până la cotă.
2. **Soluția stoc de albastru alcian de 0,02%.** 20 mg albastru alcian se dizolvă în 100 ml soluție CH_3COOH de 7%. Amestecul reagent se obține prin agitare la agitator. Apoi, soluția obținută este supusă centrifugării la 2200 rpm timp de 20 min pentru înlăturarea sedimentului insolubil. Supernatantul obținut (*soluția stoc*) este păstrat la loc ferit de lumină.
3. **Soluția de clorură de calciu de 10%.** 10 g CaCl_2 anhidru se dizolvă în 90 ml apă distilată. Soluția se agită pe un agitator până la dizolvarea completă.
4. **Alcool etilic de 85% ce conține 0,05M CaCl_2 .** Soluția se prepară prin transferarea a 0,555 g CaCl_2 într-un balon cotat de 100 ml, care se dizolvă în 1 - 2 ml apă distilată. Volumul soluției se aduce la cotă cu alcool etilic de 85%.

5. **Soluția de lucru de albastru alcian în 7% CH₃COOH cu pH 2,5.** Din soluția stoc prin diluare cu sol. 7% CH₃COOH se prepară soluția de lucru, care are absorbanța la 610 nm mai mică sau egală cu 1,0.
6. **Soluția de acid clorhidric 0,1N.** 2,07 ml acid clorhidric de 37% se dizolvă în 80 ml apă distilată. După răcire acidul clorhidric se trece într-un balon cotat de 100 ml și volumul se aduce la cotă cu apă distilată.
7. **Soluția stoc de caragenan cu concentrația 0,5 mg/ml.** 50 mg caragenan se transferă cantitativ într-un balon cotat de 100 cm³, se adaugă 50 ml apă distilată și se lasă timp de 30 min pentru umectare. Amestecul se încălzește pe baia de apă până la dizolvarea completă. Se aduce volumul până la cotă cu apă distilată și se agită. Se obține soluția standard ce conține caragenan în cantitate de 0,5mg/cm³.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru veridicitatea statistică a rezultatelor probelor din eșantion, se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru hidroliza acidă și 3 eprubete pentru proba control. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. Pregătirea probelor.

a) Biomasa standardizată (10 mg/ml) este supusă procedurii de congelare - decongelare cel puțin de 6 ori pentru a distruge peretele celular. Biomasa supusă analizei este diluată de 10 ori. Din fiecare probă, în eprubetă se colectează câte 0,5 ml biomasă (în total trei eprubete).

b) Separarea exopolizaharidelor din mediul cultural (*Arthrospira platensis* (spirulina), *Nostoc linckia*, *Porphyridium cruentum*): Suspensia de cianobacterii sau microalge se separă de lichidul cultural prin filtrare

(spirulina) sau centrifugare (*nostoc*, *porfiridium*). Lichidul cultural se colectează și este supus analizei.

Determinarea conținutului de polizaharide sulfatate:

1. *Pregătirea probelor experimentale.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2 ml se iau câte 0,5 ml probă (lichid cultural sau biomasă nativă diluată), se adaugă 1,25 ml acetonă răcită la temperatura de 4°C pentru precipitarea exopolizaharidelor și se lasă la rece pentru 30 min. Probele se centrifughează la 11000 rpm timp de 15 min. Supernatantul se înlătură, iar precipitatul se spală cu 2,0 ml soluție de CaCl₂ 0,05M în alcool etilic de 85%. Probele sunt incubate pentru 30 min la temperatura camerei, după care se supun centrifugării la 11000 rpm timp de 15 min. Supernatantul se înlătură, iar precipitatul este supus analizei.

2. *Pregătirea probei de referință.* Apa distilată este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

3. *Pregătirea soluției de lucru de albastru alcian cu pH-ul 1,0 - 1,5.* La 50 ml soluție stoc de albastru alcian se adaugă 150 ml soluție HCl de 0,1N, se agită și se centrifughează la 2400 rpm timp de 10 min. Se măsoară absorbanta la 610 nm, valoarea căreia este mai mică sau egală cu 1,0.

4. *Construirea curbei de calibrare.* Curba de calibrare se construiește în baza unor diluții succesive ale soluției standard de caragenan ce conține 0,01 - 0,1mg/ml (sau 10 - 100 μg/ml) caragenan. Diluțiile sunt preparate corespunzător în triplicat.

Pentru construirea curbei de calibrare se iau câte 0,5 ml soluție standard de caragenan la care se adaugă 1,5 ml alcool de 85%, ce conține CaCl₂ 0,05M. Probele astfel preparate se agită și se lasă pentru 60 min la temperatura camerei pentru precipitarea polizaharidelor, după care se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Se înlătură supernatantul, după care la precipitat se adaugă 2,0 ml soluție de lucru de albastru alcian în 7% CH₃COOH. Probele

se agită bine timp de 20 min și se lasă la temperatura camerei pentru 60 min. După expirarea timpului de incubare, probele se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min și se colectează supernatantul pentru care se înregistrează absorbanta la 610 nm. În mod analog se procedează cu proba control pentru care în eprubetă se iau 2,0 ml soluție de lucru de albastru alcian în 7% CH₃COOH. Se măsoară absorbanta la 610 nm în cuve de 1cm (față de H₂O) și se determină diferența dintre absorbanta probei control și a celei analizate. Se determină coeficientul de recalcul.

Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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 polizaharidelor sulfatate. Formula de calcul este $K=C/A_{610}$, unde C - concentrația caragenanului în probe, mg/ml, A₆₁₀ - absorbanta probei la 610 nm. Curba de calibrare se construiește de fiecare dată când sunt preparați reagenții.

4. *Calculul conținutului cantitativ de polizaharide sulfatate în probe se efectuează :*

1) În baza coeficientului determinat experimental, cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{610} \cdot K \cdot \eta \cdot 100/m$, unde C - conținutul de polizaharide sulfatate în probă, %; A₆₁₀ - absorbanta la 610 nm; K - coeficientul de recalcul (în mg polizaharide sulfatate/ml) determinat din curba de calibrare; η - diluția; 100 - coeficientul de trecere la %; m - masa probei pentru analiză, mg. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

2) Absorbanta probelor experimentale se înregistrează și cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin

valorile conținutului de polizaharide sulfatate în probe. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

2.3 Determinarea conținutului de ficobiliproteine

Principiul metodei:

Metoda spectrofotometrică de determinare a ficobiliproteinelor are la bază determinarea valorilor maxime ale absorbanței, specifice pentru extractul hidric de C - ficocianină la lungimea de undă de 620 nm (610 - 620 nm); pentru extractul hidric de aloficocianină - la 650 nm (650 - 655 nm) și pentru extractul hidric de R - ficoeritrină - la 562 nm (540 - 570 nm). Se va ține cont de ficobiliproteinele specifice cianobacteriilor și microalgelor.

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil.

Veselă de laborator:

1. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml;
2. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
3. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
4. Baghetă din sticlă.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru veridicitatea statistică a rezultatelor se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare câte 3 eprubete.

2. *Pregătirea probelor experimentale.* În eprubete Eppendorf se ia câte 1,0 ml biomasă standardizată la 10 mg/ml, care a fost supusă procedurii de congelare - decongelare cel puțin de 8 ori. Probele se centrifughează la un regim de 11000 rpm, timp de 10 min. Supernatantul se colectează în eprubete de centrifugare din sticlă.

Determinarea ficobiliproteinelor:

1. Pregătirea probelor experimentale:

Supernatantul colectat se diluează cu apă distilată, astfel încât absorbanta la lungimea de undă de 620 nm să fie sub unitate. Probele diluate se agit lent și se înregistrează absorbanta probelor la lungimile de undă de 620 nm și 650 nm în raport cu proba oarbă (apă distilată) în cazul cianobacteriei spirulinei și la lungimile de undă de 565 nm, 620 nm și 650 nm în raport cu proba oarbă (apă distilată) în cazul porfiridiumului.

2. *Calculul conținutului cantitativ de ficobiliproteine* se efectuează în baza ecuațiilor:

I. Siegelman & Kycia (1978):

1) C - ficocianina: $PC = (A_{620} - 0,474 \cdot A_{650}) \cdot \eta \cdot 100 / (5,34 \cdot m)$, unde PC - conținutul de ficocianină, % biomasă; A_{620} - absorbanta la 620 nm; A_{650} - absorbanta la 650 nm; η - diluția, ml; 100 - coeficientul de trecere la %; m - masa probei pentru analiză, mg.

2) Aloficocianina: $APC = (A_{650} - 0,208 \cdot A_{620}) \cdot \eta \cdot 100 / (5,09 \cdot m)$, unde APC - conținutul de aloficocianină, % biomasă; A_{620} - absorbanta la 620 nm; A_{650} - absorbanta la 650 nm; η - diluția, ml; 100 - coeficientul de trecere la 100%; m - masa probei pentru analiză, mg.

3) R - ficoeritrina (*Porphyridium cruentum*, *Nostoc linckia*)

$PE = (A_{565} - 2,41 \cdot (PC) - 0,849 \cdot (APC)) \cdot \eta \cdot 100 / 9,62 \cdot m$, unde PE - conținutul de ficoeritrină, % biomasă; A_{565} - absorbanta la 565 nm; PC - concentrația ficocianinei; APC - concentrația aloficocianinei; η - diluția, ml; 100 - coeficientul de trecere la %; m - masa probei pentru analiză, mg.

II. Bennet and Bogorad, 1973; Bryant 1979.

1) C - ficocianina: $PC \text{ (mg/ml)} = (A_{620} - 0,7 \cdot A_{650}) / 7,38$;

2) Aloficocianina: $APC \text{ (mg/ml)} = (A_{650} - 0,19 \cdot A_{620}) / 5,65$;

3) R - ficoeritrina: $PE \text{ (mg/ml)} = (A_{565} - 2,8 \cdot [PC] - 1,34 \cdot [APC]) / 12,7$.

Conținutul în % biomasă a ficobiliproteinelor se calculează în baza valorilor masei probei (10 mg) și diluția, asemănător calculului anterior ($\eta \cdot 100 / m$). Valorile absorbantei probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul.

2.4 Determinarea conținutului de clorofilă și caroten

Principiul metodei:

Metoda spectrofotometrică are la bază determinarea valorilor maxime ale absorbantei, specifice pentru extractul etanolic de pigmenți (clorofila, carotenul) cu calculul cantitativ în baza formulei (Sukenik et al., 1989, Liebenberg, 2004) și pentru β - caroten - cu aplicarea coeficientului de extincție (Rodriguez - Amaya, 2001) sau în baza curbei de calibrare.

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm cu capac;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;

5. Baie de apă;
6. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;

Veselă de laborator:

1. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml. Pentru a exclude evaporarea alcoolului, se folosesc capace din plastic.
2. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Alcool etilic de 96%;
2. Metanol, grad puritate $\geq 99,8$;
3. B - caroten, grad puritate $\geq 98,8$ cu specificația solubil în etanol.

Prepararea reagenților:

1. Soluția stoc de β -caroten cu concentrația de 0,1 mg/ml. 2,5 mg β - caroten se dizolvă în 1 ml metanol și se trece cantitativ cu alcool etilic într-un balon cotat de 25 ml.

Pregătirea pentru analiză:

1. Pregătirea eprubetelor. Pentru veridicitatea statistică a rezultatelor probelor din eșantion, se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru extragerea pigmentilor. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. Pregătirea probelor pentru extragerea pigmentilor. Biomasa standardizată (10 mg/ml) este supusă procedurii de congelare - decongelare cel puțin de 8 ori pentru a distruge peretele celular. Din fiecare probă, în eprubete se colectează câte 1,0 ml biomasă (trei eprubete) și se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Supernatanul se înlătură. La sedimentul obținut se adaugă 1,0 ml etanol de 96%. Extragerea pigmentilor se efectuează la temperatura camerei prin agitare timp de 120 min. Probele se supun

centrifugării la 11000 rpm timp de 10 min. Extractele obținute (supernatantul) sunt supuse analizei.

3. *Pregătirea probelor pentru extragerea pigmentilor din biomasa de hematococ, ciști bruni.* Biomasa standardizată de hematococ colectată în faza de ciști bruni (10 mg/ml) se centrifugează timp de 5 min la 2200 rpm.

4. *Hidroliza acidă a biomasei de ciști bruni.* La probele de biomasă de hematococ ciști bruni rezultate după centrifugare se adaugă 1,0 ml acid clorhidric de 0,1M. Suspensia obținută se supune incubării pe baia de apă la temperatura de 90°C timp de 10 min. Probele se răcesc sub jet de apă rece. Acidul se înlătură prin decantare. Biomasa supusă hidrolizei se spală cu apă distilată. Pentru aceasta în eprubetele cu biomasa supusă hidrolizei se adaugă 6 - 7 ml apă distilată. Eprubetele se agită, iar apa se elimină prin decantare (ciștii rămân în sediment). Procedura se repetă de trei ori. După a treia spălare biomasa se separă prin centrifugare la 2200 rpm timp de 3 min. Sedimentul este utilizat pentru extragerea carotenului.

Determinarea conținutului de pigmenti în baza formulelor de calcul:

1. *Pregătirea probelor experimentale.* La volumul de 0,1 ml extract alcoolic se adaugă 3 ml alcool etilic de 96%. Se obține diluția de 31 ori. Pentru probele obținute în așa fel se înregistrează absorbanta la lungimile de undă de 470 nm și 665 nm în raport cu proba oarbă (alcool etilic).

2. *Calculul conținutului cantitativ al pigmentilor* se efectuează în baza formulelor (Suknik, 1989):

Clorofila *a* (mg/ml) = $13,15 \cdot A_{665} \cdot 10$, unde A_{665} - absorbanta la 665 nm;

Caroten total (mg/ml) = $4,4 \cdot A_{470} \cdot 10$, unde A_{470} - absorbanta la 470 nm.

Pentru determinarea conținutului de β - caroten se înregistrează absorbanta extractului etanolic la lungimea de undă de 450 nm.

Conținutul β -carotenului se calculează conform formulei:

$C = A_{450} \cdot 103/2620$, unde C - concentrația β - carotenului, mg/100g; A_{450} = absorbanta extractului etanolic de β - caroten la lungimea de undă de 450 nm; 2620 - coeficientul de extincție specifică a β - carotenului în etanol.

Determinarea conținutului de β - caroten în baza curbei de calibrare:

1. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru curba de calibrare se utilizează soluția etanolică de β - caroten cu concentrația de 0,1 mg/ml. Diluțiile sunt preparate în triplicat. Se iau câte 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml...0,9 ml din soluția standard de caroten. Volumul probelor se aduce la 1 ml cu alcool etilic și se înregistrează absorbanta la lungimea de undă de 450 nm în raport cu proba oarbă (etanol).

Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. Se verifică r^2 , pentru care valoarea acceptată este de 0,99. Se obține valoarea pentru coeficientul K , utilizat în calculul cantitativ al β - carotenului. Formula de calcul este $K=C/A_{450}$, unde C - concentrația β - carotenului în probe, mg/ml, A_{450} - absorbanta probei la 450 nm.

2. *Calculul conținutului cantitativ de β - caroten în probe se efectuează:*

a) În baza coeficientului determinat experimental cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{450} \cdot K$, unde C - conținutul de β - caroten în probă, mg/ml; A_{450} - absorbanta la 450 nm; K - coeficientul de recalcul (în mg β - caroten/ml) determinat din curba de calibrare; În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

b) Absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile conținutului de β - caroten în probe. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

Pentru determinarea conținutului de β - caroten în % biomasă sau mg/g biomasă în calculul respectiv se introduc valoarea diluției și masa probei.

2.5 Determinarea conținutului de astaxantină

Principiul metodei:

Metoda spectrofotometrică are la bază determinarea valorilor maxime ale absorbanței, specifice pentru extractul etanolic de astaxantină cu calculul cantitativ în baza curbei de calibrare.

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm cu capac;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;
5. Baie de apă;
6. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil.

Veselă de laborator:

1. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml dotate cu capac;
2. Balon cotat cu volumul de 100 ml;
3. Pahar gradat din sticlă cu volumul de 25 - 50 ml;
4. Pipete gradate din sticlă cu volumul de 1,0 ml;
5. Pipete gradate din sticlă cu volumul de 0,1 ml;
6. Pipete gradate din sticlă cu volumul de 10 ml;
7. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Acid clorhidric (HCl) concentrat, chimic pur;

2. Alcool etilic (C_2H_5OH) de 96%;
3. Cloroform ($CHCl_3$) distilat;
4. Astaxantină sintetică ($C_{40}H_{52}O_4$), grad puritate $\geq 98,8$.

Prepararea reagenților:

1. **Soluția de acid clorhidric de 0,1M.** În 60 ml apă distilată se dizolvă cantitatea de 3,14 ml acid clorhidric concentrat (densitatea 1,16 g/cm³). Soluția obținută se trece într-un balon cotat de 100 ml și se aduce volumul la cotă cu apă distilată.
2. **Soluția stoc de astaxantină cu concentrația de 0,01 mg/ml.** 1,0 mg astaxantină se dizolvă în 1 ml cloroform și se trece cantitativ cu alcool etilic într-un balon cotat de 100 ml.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru veridicitatea statistică a rezultatelor se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru extragerea pigmentului. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Pregătirea probelor pentru extragerea astaxantinei.* Biomasa standardizată de hematococ, aplanospori (10 mg/ml) se centrifugează timp de 5 min la 2200 rpm.

3. *Hidroliza acidă a biomasei de hematococ (ciști roșii și ciști bruni).* La probele de biomasă rezultate după centrifugare se adaugă 1 ml acid clorhidric de 0,1M. Suspensia obținută se supune incubării pe baia de apă la temperatura de 90°C timp de 10 min. Probele se răcesc sub jet de apă rece. Acidul se înlătură prin decantare. Biomasa supusă hidrolizei se spală cu apă distilată. Pentru aceasta în eprubetele cu biomasa supusă hidrolizei se adaugă 6 - 7 ml apă distilată. Eprubetele se agită, iar apa se elimină prin decantare (ciști rămân

în sediment). Procedura se repetă de trei ori. După a treia spălare biomasa se separă prin centrifugare la 2200 rpm timp de 3 min.

4. *Extragerea astaxantinei.* La biomasa supusă procedurii de hidroliză acidă și spălată se adaugă 5 ml alcool etilic. Extragerea are loc la temperatura camerei prin agitare timp de 120 min. După separarea extractului etanolic prin decantare se repetă procedura de extragere cu etanol. La biomasa de ciști se adaugă 5 ml etanol. Timpul de extragere prin agitare este de 60 min. Ambele extracte de astaxantină se amestecă și se verifică puritatea astaxantinei în baza spectrului de absorbție.

5. *Verificarea purității astaxantinei în extractul etanolic.* Într-o eprubetă se ia 0,1 ml extract astaxantină la care se adaugă 3,0 ml alcool etilic. Se înregistrează spectrul de absorbție a probei în diapazonul 400 - 700 nm. Maximul de absorbție specific pentru astaxantina în alcool etilic este determinat la 478 nm. Se determină un singur maximum de absorbție.

Determinarea conținutului de astaxantină în baza curbei de calibrare:

1. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru a construi curba de calibrare se utilizează soluția etanolică de astaxantină de 0,01 mg/ml. Concentrațiile sunt preparate corespunzător în triplicat. Se iau 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml...0,9 ml din soluția standard de astaxantină. Volumul probelor se aduce la 1,0 ml cu alcool etilic și se înregistrează absorbanța la lungimea de undă de 478 nm în raport cu proba oarbă (etanol). Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. Se verifică r^2 , pentru care valoarea acceptată este de 0,99. Se obține valoarea pentru coeficientul K utilizat în calculul cantitativ al astaxantinei, determinat conform formulei: $K=C/A_{478}$, unde C - concentrația astaxantinei în probă, $\mu\text{g/ml}$, A - absorbanța probei la 478 nm.

2. *Calculul conținutului cantitativ de astaxantină în probe se efectuează:*

a) În baza coeficientului determinat experimental cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{478} \cdot K$, unde C - conținutul de astaxantină în probă, $\mu\text{g/ml}$; A_{478} - absorbanta la 478 nm; K - coeficientul de recalcul (în μg astaxantină/ml) determinat din curba de calibrare. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

b) Absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile conținutului de astaxantină în probe. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

Pentru calculul valorilor conținutului de astaxantină în % biomasă, mg/g biomasă sau mg/l cultură microalgală se ține cont de valoarea diluției și masa probei.

2.6 Determinarea conținutului de lipide

2.6.1 Metoda spectrofotometrică de determinare a lipidelor

Principiul metodei:

Metoda are la bază reacția de culoare dintre produsele degradării lipidelor cu componentele reagentului fosfo-vanilinic. Intensitatea culorii obținute depinde de cantitatea lipidelor în probă. Lipidele sunt supuse hidrolizei acide. Produsele hidrolizei lipidelor formează cu reagentul fosfo - vanilinic culoarea roză.

Reacția sulfo – fosfo - vanilinică (SPV) 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 (Vatassery și colab., 1981). Pentru biomasa algală metoda dată

se aplică tot mai frecvent, înlocuind metoda gravimetrică Folch (Bligh, 1959). Avantajul metodei constă în rapiditatea efectuării, posibilitatea testelor repetate, sensibilitatea înaltă, adaptarea materialului biologic utilizat. Metoda este utilizată frecvent în cercetările ficologice (Park, 2016)

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Cuve din sticlă cu drumul optic de 1 cm;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
5. Baie de apă;
6. Pipete din sticlă analitice cu volumul de 1 - 5 ml și 100 - 1000 μ l sau pipete mecanice mono - canal cu volumul fixat sau variabil;
7. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;
8. Vortex mixer de laborator.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml
2. Balon volumetric cu volumul de 500 ml cu eroarea absolută $\pm 0,05$ ml
3. Eprubete din plastic cu dop pentru centrifugare;
4. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml. Pentru a exclude evaporarea apei din eprubetă în timpul hidrolizei, se folosesc capace speciale pentru procesul de fierbere;
5. Pahar chimic cu volumul de 200 ml;
6. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
7. Baghetă din sticlă.

Pregătirea vaselor: Toate vasele sunt spălate bine cu o perie de bicarbonat de sodiu și clătite cu apă distilată. Vasele sunt uscate în dulap de uscare. În lucru se folosesc doar vase uscate.

Reagenți:

1. Cloroform (CHCl_3) distilat;
2. Acid sulfuric concentrat (H_2SO_4), chimic pur;
3. Acid orto - fosforic 85% (H_3PO_4), chimic pur;
4. Vanilină (4-(HO) C_6H_3 -3-(OCH₃)CHO), grad puritate $\geq 98\%$
5. Clorură de sodiu (NaCl), chimic pur;
6. Acid oleic;
7. Apă distilată;
8. Alcool etilic de 96%.

Prepararea reagenților:

1. **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.
2. **Reagentul fosfo - vanilinic:** Se cântăresc 0,75 g vanilină și se trec într-un pahar din sticlă 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 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.
3. **Soluția de clorură de sodiu de 0,9%:** Se cântăresc 0,9 g NaCl și se trec într-un pahar din 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 pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru veridicitatea statistică a rezultatelor probelor din eșantion se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru hidroliza acidă și 3 eprubete pentru proba control. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Extragerea lipidelor.* La sedimentul rezultat din centrifugarea a 1,0 ml biomasă se adaugă 1 ml amestec extractant. Eprubetele sunt închise cu dop și supuse agitării la temperatura camerei timp de 120 min.

După expirarea timpului, din eprubete se colectează extractul lipidic (amestecul extractant) și se transferă în eprubete din sticlă. La conținutul eprubetei se adaugă 1,0 ml NaCl 0,9%. Amestecul se agită și se centrifughează la 2200 rpm. Supernatantul (alcoolul etilic cu clorura de sodiu) este înlăturat. Extractele cloroformice sunt plasate sub nișa de ventilare până la evaporarea completă a amestecului (12 ore).

3. *Pregătirea probelor pentru hidroliza acidă.* La conținutul eprubetelor (extractul lipidic) se adaugă 1,0 ml acid sulfuric concentrat. Eprubetele se agită puțin și se plasează pe baia de apă cu temperatura de 90⁰C pentru 20 min. După expirarea timpului probele sunt răcite sub jet de apă curentă până la temperatura camerei.

Determinarea lipidelor:

1. *Pregătirea probelor experimentale.* În eprubete pentru centrifugare din sticlă uscate se iau 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 în raport cu proba oarbă.

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

3. *Pregătirea probelor standard de lipide.* În calitate de standard lipidic se utilizează amestecul constituit din acid oleic în etanol cu concentrația lipidelor de 0,1 mg/ml. Se prepară 3 - 5 probe cu concentrații diferite în alcool. La 0,1 ml probă acid oleic preparată se adaugă 1,0 ml acid sulfuric concentrat. Probele se supun hidrolizei pe baia de apă la 100°C pentru 30 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 în raport cu proba oarbă.

3. *Calculul conținutului cantitativ de lipide în probe* se efectuează în baza coeficientului, cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{520} \cdot C_{st} \cdot 100 / A_{st} \cdot m$, unde C - conținutul lipidelor în biomasă, %; A_{520} - absorbanta la 520 nm; A_{st} - absorbanta probei standard; C_{st} - concentrația lipidelor în proba standard, mg/ml; 100 - coeficientul de trecere la %; m - masa probei pentru analiză, mg. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul.

2.6.2 Metoda gravimetrică de determinare a conținutului de lipide

Principiul metodei:

Aplicarea metodei gravimetrice de determinare a lipidelor presupune inițial extragerea lor din biomasa luată în analiză. Extragerea lipidelor din microalge și cianobacterii se efectuează în dependență de clasele de lipide prezente în biomasă. Prepararea biomasei, ca etapă premergătoare extragerii propriu-zise, prin uscare, liofilizare sau înghețare mărește durata și costul extragerii. Din acest motiv, extragerea lipidelor din biomasa nativă simplifică mult acest proces și reduce din costul produsului finit.

Criteriul, în baza căruia are loc selectarea sistemelor de extracție, este natura substanței/substanțelor care urmează a fi extrase. Se aplică de obicei două abordări: extragerea lipidelor totale și extragerea acizilor grași, când avem nevoie să monitorizăm suma lor, raportul dintre acizii saturați și nesaturați. Un alt criteriu este natura materialului din care se efectuează extragerea. Experiența arată, că sistemele eficiente de extracție sunt specifice (determinate de apartenența la specie a materialului) și din această cauză, orice metodă de extragere foarte eficientă pentru o cultură, poate da rezultate mai joase pentru o altă cultură, ceea ce solicită o implicare creativă a cercetătorului în scopul adaptării procedeeleor deja elaborate pentru necesitățile propriilor investigații. Anume din acest punct de vedere este foarte dificil de a face o comparație între datele cu referire la lipidele totale extrase.

Una din abordările reușite din punct de vedere practic este selectarea sistemului de extragere în conformitate cu unele criterii utile ce oferă în primul rând facilități tehnice. Atunci când se va efectua extragerea lipidelor totale, cerințele față de metoda „ideală” de extragere a lor sunt următoarele:

- a) să asigure cantitatea maximală a produselor extrase, preferențial lipidice;
- b) să nu afecteze structura nativă a produselor extrase pentru a nu compromite utilizarea lor în continuare;

c) să reducă maximal timpul util cheltuit;

d) să reducă maximal volumul solvenților și implicit, nivelul cheltuielilor.

Pentru extragerea completă a lipidelor, este necesar de a rupe legăturile dintre lipide și compușii non - lipidici celulari (legăturile Van – der - Waals, de hidrogen, electrostatice și covalente). Este important ca radicalii obținuți în urma acestor reacții să nu provoace degradarea lipidelor, iată de ce se cere reducerea timpului contactului biomasei cu solvenții. Alcoolul din componența sistemelor de extragere inactivează lipazele din biomasa microalgelor și cianobacteriilor, înlesnește ruperea complexului lipoproteic al aminoacizilor, glucidelor, proteinelor hidrofobe și a pigmentilor.

Metodele de purificare a extractelor lipidice se bazează pe afinitatea diferită a lipidelor polare și a reziduului față de unii solvenți. Extractele lipidice pot fi tratate cu solvenți nepolari cum ar fi cloroformul, hexanul sau eterul dietilic în cazul reziduurilor puțin solubile în apă. Nici una din sistemele extractante nu garantează obținerea extractului complet, fiecare din ele presupunând anumite pierderi calitative și cantitative.

Cele mai eficiente sisteme de extragere a lipidelor din microorganisme, elaborate până în prezent sunt: 1) amestecul de 2:1 (v/v) cloroform - metanol (Kates, 1988); 2) amestecul 1:2:0,8 (v/v/v) cloroform – metanol - apă utilizat de Bligh și Dyer pentru extragerea într-o singură fază (Bligh, 1959) și 3) modificarea amestecului Folch: cloroform – etanol în raport 2:1 (v/v) (Folch, 1957). Unicul dezavantaj al sistemelor de mai sus este toxicitatea cloroformului și metanolului, substituirea lor prezentând însă unele deficiențe, ca de exemplu creșterea cantității impurităților din extractul lipidic, pentru înlăturarea cărora Kates a propus spălarea extractului lipidic obținut cu soluție izotonică de clorură de sodiu (Kates, 1988).

Compararea eficienței metodelor de extragere a lipidelor din microorganisme și a eficacității solvenților indică asupra faptului că pentru microalge și cianobacterii cele mai biocompatibile sisteme extractante sunt

etanolul (96%) și sistemele: hexan - etanol 96% (1:2,5 v/v), cloroform - etanol - apă (2:1:0,8 v/v). În cazul unui conținut înalt de acizi grași polienici, alcoolul etilic de 96% este mult mai eficient datorită polarității sale ridicate, iar în cazul unor cantități relativ mici de lipide cea mai eficientă metodă rămâne a fi cea clasică cu utilizarea cloroformului (Kates 1988).

Pentru a obține lipidele totale din biomasa de dunalielă este utilizată metoda adaptată, la baza căreia se află metodele tradiționale. Se aplică sistemul de solvenți care constă din cloroform – etanol - apă în raport de 2:1:0,8, care permite de a micșora durata extragerii la 60 min. Reducerea timpul de contact al solvenților cu biomasa diminuează posibilitatea emulsionării extractului și reacțiile de oxidare. Extragerea lipidelor din biomasă are loc în două etape:

Extragerea lipidelor:

1. *Pregătirea probelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 variante de biomasă. În experiența de extragere se respectă raportul dintre cantitatea de biomasă și volumul amestecului extractant. Pentru 1,0 g biomasă se iau 76 ml sistem extractant care constă din cloroform – etanol - apă în raport de 2:1:0,8 v/v/v.

2. *Extragerea lipidelor.* La prima etapă, biomasa nativă se separă de mediul de cultivare prin filtrare (spirulina) sau centrifugare (microalgele), sărurile din mediul de cultivare se elimină prin spălarea repetată a biomasei cu soluția de acetat de amoniu. Se determină gradul de umiditate care nu va depăși 30%. În cazul biomasei native se elimină apa din amestecul extractant, suficient fiind conținutul de apă din biomasă.

În scopul măririi vitezei de contact dintre solvent și membrane biomasa se spală cu apă distilată, procedura fiind urmată de liza celulelor, ceea ce favorizează extragerea lipidelor. Pentru extragerea lipidelor se utilizează

volumul total de alcool și doar o treime din volumul de cloroform, prin urmare la etapa dată se extrag majoritatea lipidelor polare. Amestecul reactant se plasează într-un vas din sticlă cu șlif. Extragerea se efectuează la temperatura camerei prin agitare continuă timp de 30 min.

La etapa a doua a extragerii, se utilizează restul volumului de cloroform pentru extragerea lipidelor nepolare, care se adaugă la amestecul reactant. Extragerea se efectuează la temperatura camerei, prin agitare continuă timp de 30 min.

3. *Obținerea extractului cloroformic de lipide.* Din amestecul reactant se elimină, prin decantare, impuritățile nelipidice și etanolul. Pentru aceasta, extractul cloroform - etanolic de lipide obținut, se spală de cinci ori cu 1/5 volum (din volumul extractului) soluție de 0,9% clorură de sodiu. Urmele de apă se înlătură prin filtrarea extractului cloroformic prin sulfat de sodiu anhidru. Soluția cloroformică rezultată conține lipidele extrase. Cloroformul se înlătură prin distilare la evaporatorul cu vid la temperatura de 40°C.

4. *Determinarea cantității de lipide.* Masa lipidică obținută se usucă la temperatura $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ până la masa stabilă, pentru care se cântărește cel puțin de 3 ori. Prin utilizarea raportului dintre cantitatea lipidelor obținute și biomasa utilizată la extragere se determină conținutul lipidelor în biomasă.

2.7. Determinarea produselor degradării oxidative a lipidelor, testul TBARS

Principiul metodei:

Determinarea produselor degradării oxidative a lipidelor în biomasa cianobacteriană și microalgă prin calculul conținutului de dialdehidă malonică (DAM) în baza substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric (ATB) - testul TBARS - este o metodă indirectă de stabilire a acumulării radicalilor liberi în biomasă. Rezultatele testului conținutului de dialdehidă

malonică 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 cu formarea produsului colorat în roz cu maximul de absorbție la 532 nm (Heath, 1968).

Este una din metodele de determinare a statutului oxidativ al biomasei, care demonstrează în mod indirect deplasarea statutului redox în favoarea proceselor de reducere sau a proceselor de oxidare cu acumularea radicalilor liberi, care induc oxidarea lipidelor. În cazul biomasei cianobacteriene și microalgale, culoarea produselor nespecifice (ficobiliproteinele) se exclude prin înregistrarea absorbției la 600 nm.

Echipament:

1. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
2. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
4. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbției;
5. Baie de apă.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete gradate din plastic cu dop pentru centrifugare cu volumul de 10 ml;
3. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml cu capace speciale;
4. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
5. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
6. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Acid tricloracetic (CCl_3COOH), grad puritate >99%
2. Acid tiobarbituric ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$), grad puritate 98%

Prepararea soluțiilor:

1. **Soluția de acid tricloracetic de 10%.** 20 g (masă uscată) CCl_3COOH se trece într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml și se dizolvă în apă distilată. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.
2. **Soluția de acid tiobarbituric de 0,76%.** 760 mg acid tiobarbituric se trece într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml. Se adaugă circa 50 ml acid tricloracetic de 10% și se plasează pe baia de apă (90°C) până la dizolvarea completă, apoi volumul se aduce la cotă cu acid tricloracetic 10%. Soluția se prepară în ziua utilizării. Volumul de lucru a acidului tiobarbituric se calculează în baza numărului de probe.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Pregătirea probelor experimentale.* 1,0 ml probă de biomasă (10 mg/ml) se centrifughează la 11000 rpm în eprubete Eppendorf (2,0 ml). După centrifugare supernatantul se înlătură. Biomasă sedimentată se amestecă cu 3,0 ml acid tiobarbituric (0,76%) și se trece în eprubete din sticlă.

3. *Pregătirea probelor pentru hidroliza acidă.* Amestecul reactant care constă din biomasă și acid tiobarbituric se incubează pe baia de apă la 95°C timp de 40 min. În continuare, probele se răcesc sub jet de apă rece și se centrifughează la 11000 rpm.

Determinarea conținutului de dialdehidă malonică

1. *Pregătirea probelor.* În eprubete din sticlă se transferă supernatantul obținut în rezultatul centrifugării probelor supuse hidrolizei. Se înregistrează absorbanta probelor la două lungimi de undă 535 nm și 600 nm. În calitate de probă oarbă se utilizează amestecul din care lipsește materialul biologic. Pentru calculul specific al dialdehidei malonice se face diferența dintre valorile absorbantei determinată la 534 nm și la 600 nm.

2. *Pregătirea probei oarbe.* Se amestecă 0,1 ml apă distilată cu 3,0 ml acid tiobarbituric. Se utilizează în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

3. *Calculul conținutului cantitativ al dialdehidei malonice.* Absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. Conținutul cantitativ de dialdehidă malonică în probe se calculează cu utilizarea coeficientului de extincție a produsului complexului DAM - ATB: DAM echivalent (nM cm^{-1}) = $1000[(A_{523}-A_{600})/155]$, unde A_{523} - absorbanta 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.

2.8 Determinarea conținutului de fenoli

Principiul metodei:

Metoda are la bază transferul de electroni produs în mediul alcalin cu reducerea complexului acid fosfomolibdenic - fosfovolfraemic cu formarea cromogenului, care se determină spectrofotometric (Magalhaes, 2008; Singleton, 1965;).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei;

2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Baie de apă.

Vesela de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete gradate din plastic cu dop pentru centrifugare cu volumul 10 ml;
3. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml;
4. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
5. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
6. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Reagent Folin - Ciocalteu 2N, Merck;
2. Bicarbonat de sodiu (NaHCO_3), chimic pur;
3. Acid galic $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, grad puritate ≥ 98 .

Prepararea soluțiilor:

- 1. Soluția de lucru Folin - Ciocalteu.** 10 ml reagent Folin-Ciocalteu se trec într-un balon cotat cu volumul de 100 ml. Soluția se aduce la cotă cu apă distilată. Se obține diluția de 10 ori a reagentului. Volumul soluției de lucru Folin-Ciocalteu se calculează în baza numărului de probe.
- 2. Soluția de bicarbonat de sodiu de 7,5%.** 7,5 g bicarbonat de sodiu se dizolvă în 50 ml apă distilată. Soluția se trece într-un balon cotat de 100 ml și se aduce volumul la cotă cu apă distilată.
- 3. Soluția stoc de acid galic cu concentrația de 1 mg/ml.** 10,0 mg acid galic se dizolvă în 50 ml apă distilată și se trece într-un balon cotat de 100 ml. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă distilată.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru veridicitatea statistică se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Prepararea extractelor hidrice.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml se iau câte 1,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) și se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Supernatantul obținut se colectează în alte eprubete Eppendorf. Extractul hidric obținut este de culoarea specifică conținutului pigmentilor hidrosolubili. Se păstrează sub formă congelată.

Determinarea conținutului de fenoli:

1. *Pregătirea probelor experimentale.* În eprubete din sticlă se transferă 0,3 ml extract biomasă la care se adaugă 1,5 ml reagent Folin - Ciocalteu, soluția de lucru și 1,2 ml soluție de bicarbonat de sodiu de 7,5%. Amestecul obținut se agită și se incubează la 50°C timp de 30 min (parametri stabiliți experimental, care pot fi modificați). Se determină absorbanta la 760 nm.

2. *Pregătirea probei oarbe.* Se amestecă 0,3 ml apă distilată cu 1,5 ml reagent Folin - Ciocalteu, diluția 10 ori și cu 1,2 ml soluție de bicarbonat de sodiu. Proba este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

3. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru a construi curba de calibrare se prepară soluții cu concentrații diferite de acid galic în apă. În eprubete gradate cu volumul de 10 ml se prepară amestecurile de soluție stoc trolox 1 mM și apă distilată (Tabelul 1).

Tabelul 1. Prepararea soluțiilor de acid galic pentru curba de calibrare

<i>Volumul soluției de acid galic (cu concentrația de 0,1 mg/ml), ml</i>	<i>Apă distilată, ml</i>	<i>Concentrația acid galic, mg/ml</i>
0,1	0,9	0,01
0,2	0,8	0,02
0,3	0,7	0,03
0,4	0,6	0,04
0,5	0,5	0,05
0,6	0,4	0,06
0,7	0,3	0,07
0,8	0,2	0,08
0,9	0,1	0,09
10,0	0	0,1

Se prepară amestecurile reactante. În eprubete din sticlă cu volumul de 10 ml se amestecă 0,3 ml soluție de acid galic, la care se adaugă 1,5 ml reagent Folin - Ciocalteu, soluția de lucru și 1,2 ml soluție de bicarbonat de sodiu de 7,5%. Amestecul obținut se agită și se incubează la 50°C timp de 30 min. Se determină absorbanta probelor la 760 nm. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. Se verifică r^2 , pentru care valoarea acceptată este de 0,99. Se obține valoarea pentru coeficientul K utilizat în calculul cantitativ al acidului galic, determinat conform formulei $K=C/A_{760}$, unde C - concentrația acidului galic în probă, mg/ml, A_{760} - absorbanta probei la 760 nm. Curba de calibrare este lineară în intervalul 0,01 - 0,1 mg/ml acid galic.

5. Calculul conținutului fenolilor în probe se efectuează:

1) În baza coeficientului determinat experimental, cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{760} \cdot K$, unde C - concentrația de acid galic în probă, mg/ml; A_{760} - absorbanta la 760 nm; K - coeficientul de recalcul (în mg acid galic/ml) determinat din curba de calibrare. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

2) Absorbanța probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile activității antioxidante în mM trolox echivalent în 1 ml probă sau 10 mg biomasă. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

Conținutul fenolilor se exprimă în mg echivalent acid galic la ml extract sau mg, g, biomasă. Calculul se efectuează în baza conținutului de biomasă în probele experimentale (10 mg) și cantitatea de biomasă inițială a culturilor cianobacteriene sau microalgale.

3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI PUTERII DE REDUCERE A BIOMASEI DE CIANOBACTERII ȘI MICROALGE

3.1 Determinarea activității antioxidante cu aplicarea 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 antioxidant, precum și pentru determinarea calității antioxidante a produselor alimentare. Are cost redus, radicalul este stabil (Rudi, 2013, 2010; Re, 1999).

Principiul metodei:

ABTS radical cation este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) cu persulfat de potasiu. Radicalul cation ABTS este de culoare albastră, fiind utilizat în calitate de substrat, este redus prin adăugări de electroni. Soluția de ABTS redus se decolorează. Absorbanta maximală a soluțiilor radical și radical redus se determină la 734 nm. Intensitatea culorii corelează invers cu valorile antioxidante.

Metoda dată se aplică pentru determinarea activității antioxidante a extractelor hidrice, hidro - etanolice și etanolice din biomasa cianobacteriilor și microalgor.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Prepararea extractelor hidrice.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml se introduc câte 1,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) și se centrifughează la 11000 g timp de 10 min. Supernatantul obținut se colectează în alte eprubete Eppendorf. Extractul hidric obținut este de culoarea specifică conținutului pigmentilor hidrosolubili. Se păstrează sub formă congelată.

2. *Prepararea extractelor etanolice.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml se introduc câte 1,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) și se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Supernatantul obținut se înlătură, iar la biomasa sedimentată se adaugă 2 ml alcool etilic. Concentrația alcoolului etilic poate varia în dependență de scopul cercetărilor. Amestecul obținut se agită. Durata timpului de agitare depinde de biomasă și scopul cercetărilor. Eprubetele se centrifughează la 11000 rpm timp de 5 min. Extractul obținut este de culoarea specifică conținutului pigmentilor solubili în etanol. Se păstrează la temperatura de + 4°C.

3. *Prepararea extractului etanolic de astaxantină* (Miscu et al., 2010). În eprubete cu volumul de 10 ml se introduc câte 1,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) de *Haematococcus pluvialis* în faza de ciști bruni și ciști roșii. Probele se centrifughează timp de 5 min la 2200 rpm și supernatantul se elimină. La probele de biomasă rezultate după centrifugare se adaugă 1,0 ml acid clorhidric de 0,1M. Suspensia obținută se supune incubării pe baia de apă la temperatura de 90°C timp de 10 min. Probele se răcesc sub jet de apă rece. Acidul se înlătură prin decantare. Biomasa supusă hidrolizei se spală cu apă distilată. Pentru aceasta, în eprubetele cu biomasa supusă hidrolizei se adaugă 6 - 7 ml apă distilată. Eprubetele se agită, iar apa se elimină prin decantare (ciștii rămân în sediment). Procedura se repetă de trei ori. După a treia spălare, biomasa se separă prin centrifugare la 2200 rpm timp de 3 min. La biomasa supusă procedurii de hidroliză acidă și spălată se adaugă 5 ml alcool etilic. Extragerea are loc la temperatura camerei prin agitare timp de 120 min. După separarea extractului etanolic prin decantare se repetă procedura de extragere cu etanol. La biomasa de ciști se adaugă 5 ml etanol. Timpul de extragere prin agitare este de 60 min. Ambele extracte de astaxantină se amestecă și se verifică puritatea astaxantinei în baza spectrului de absorbție. În eprubetă se introduc 0,1 ml extract astaxantină la care se adaugă 3,0 ml alcool etilic. Se înregistrează spectrul de absorbție a probei în diapazonul 400 - 700 nm.

Maximul de absorbție specific pentru astaxantina în alcool etilic este determinat la 478 nm. Se determină un singur maximum de absorbție.

4. *Prepararea extractului uleios de astaxantină* (Miscu et al., 2010)
Biomasa de *Haematococcus pluviialis* cu vârsta de 20 zile, ce constă din ciști roșii este separată de lichidul cultural prin centrifugare timp de 5 min la 2200 rpm. Sedimentul celular este supus hidrolizei acide cu soluție de 0,1N HCl timp de 5 min, după care se spală abundant cu apă distilată până la neutralizarea pH-ului. În continuare, la biomasa de hematococ (0,1 g recalculat la biomasă absolut uscată) se adaugă 15 ml de ulei vegetal. Amestecul se pune pentru 3 ore pe un agitator orbital și se agită cu viteza de 800 rot/min. După aceasta reziduul de biomasă decolorat complet se separă prin decantare. Preparatul uleios de astaxantină este examinat pentru a stabili puritatea lui și concentrația produsului activ (astaxantina). În acest scop se înregistrează spectrele de absorbție ale uleiului și a preparatului uleios de astaxantină în bază de ulei vegetal în intervalul de măsurare de la 400 la 530 nm și se fixează maximumul de absorbție. Prezența unui singur maximum de absorbție în spectrul preparatului uleios de astaxantină, necaracteristic uleiului pur în domeniul lungimii de undă de 482...486 nm, indică asupra gradului înalt de puritate al produsului obținut. Concentrația astaxantinei se determină conform curbei de calibrare construită pentru soluții standard de astaxantină pură.

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500-5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30-500 rpm.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml;
3. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), grad puritate $\geq 97\%$;
2. Persulfat de potasiu $K_2S_2O_8$, grad puritate 97%;
3. Trolox - Acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilic ((\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), grad puritate $\geq 97\%$;
4. Metanol, grad puritate $\geq 98\%$;
5. Alcool etilic de 96%;
6. Apă distilată.

Prepararea soluțiilor:

1. **Soluția de persulfat de potasiu de 2,45 mM.** Se cântăresc 33 mg $K_2S_2O_8$, care se trec într-un pahar de 100 ml și se dizolvă în 20 ml apă distilată. Soluția se trece într-un balon cotate de 100 ml, volumul se aduce la cotă cu apă distilată.
2. **Soluția stoc a reagentului ABTS de 7mM.** Într-un balon cotate de 50 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, la temperatura camerei pentru 12-16 ore (timpul necesar formării radicalului ABTS).

3. Soluția standard de trolox 1 mM. Pentru aceasta într-un balon cotat de 100 ml, se dizolvă 25 mg reagent în 1 ml metanol. Volumul se aduce până la cotă cu apă distilată. Soluția se păstrează la + 4°C.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru testul antioxidant și 3 eprubete Eppendorf pentru obținerea extractelor. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Prepararea probelor (Vezi Prepararea probelor pentru testele antioxidante).*

Determinarea activității antioxidante:

1. *Prepararea soluției de lucru ABTS.* Soluția de lucru ABTS se prepară din soluția stoc de ABTS, care se dizolvă în apă distilată până la stabilizarea absorbantei de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm. Proba oarbă este apa distilată. Se utilizează aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului.

2. *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 radical ABTS la care se adaugă 0,1 ml probă. Probele se agită și la intervalul de 6 min se înregistrează absorbanta la 734 nm.

3. *Prepararea probei oarbe.* Se prepară amestecul din 0,1 ml extract în care se determină activitatea antioxidantă și 3,0 ml apă distilată sau alcool etilic, în dependență de tipul extractului. Proba obținută este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

4. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru a construi curba de calibrare se prepară (în triplicat) soluții de concentrații diferite de trolox de 1 mM în apă (Tabelul 2).

Tabelul 2. Prepararea soluțiilor trolox pentru curba de calibrare

<i>Soluție trolox 1 mM, ml</i>	<i>Apă distilată, ml</i>	<i>Concentrația trolox, mM/ml</i>
0,1	0,8	0,01
0,2	0,8	0,02
0,3	0,7	0,03
0,4	0,6	0,04
0,5	0,5	0,05
0,6	0,4	0,06
0,7	0,3	0,07
0,8	0,2	0,08
0,9	0,1	0,09
10 ml	0	1,0

Se prepară amestecurile reactante. În eprubete din sticlă de 10 ml se amestecă 3 ml soluție de lucru ABTS și 0,1 ml soluție trolox în concentrațiile de la 0,01 mM/ml la 1,0 mM/ml. Probele se agită și la expirarea a 6 min se înregistrează absorbanta la 734 nm. În calitate de probă oarbă se utilizează apa distilată. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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 calcularea cantitativă. Formula de calcul este $K=C/A_{734}$, unde C este concentrația trolox în probe, mM/ml, A_{734} - absorbanta probei la 734 nm. Curba de calibrare se construiește de fiecare dată când sunt preparați reagenții. Intervalul liniar pentru curba de calibrare este de 0,2 - 10,0 mM Trolox.

5. Calculul activității antioxidante în probe se efectuează:

1) În baza coeficientului determinat experimental, cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{734} \cdot K$, unde C - concentrația trolox în probă, mM/ml; A_{734} - absorbanta la 734 nm; K - coeficientul de recalcul (în mM trolox/ml) determinat din curba de calibrare. În cazul dat absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

2) Absorbanța probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile activității antioxidante în mM trolox echivalent în 1 ml probă sau 10 mg biomasă. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

3) Activitatea antioxidantă se exprimă în valoarea coeficientului TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) în mM Trolox la g, mg biomasă, care este reprezentativă în cazul cercetărilor în scopul propunerii biomasei în calitate de antioxidant sau ml pentru aprecierea activității antioxidante a extractelor.

Activitatea antioxidantă poate fi exprimată în % inhibiție ABTS care se calculează conform formulei: % Inhibiție = $(A_{t=0} - A_{t=6\text{min}}) / A_{t=0} \cdot 100$, unde $A_{t=0}$ - absorbanța reagentului ABTS de lucru, $A_{t=6\text{min}}$ - absorbanța amestecului reactiv după expirarea timpului de 6 min.

3.2 Determinarea activității (antioxidante) antiradicalice cu aplicarea radicalului DPPH

Metoda de determinare a activității antiradicalice cu aplicarea radicalului DPPH (1,1-difenil-2-picrililhidrazil) este un test rapid, simplu, precis și ieftin pentru a evalua capacitatea diferitor compuși de a acționa în calitate de captatori ai radicalilor liberi sau donatori de hidrogen. Metoda DPPH este descrisă ca fiind cea mai simplă și convenabilă metodă antiradicalică, care nu depinde de polaritatea probelor (Sharma, 2008; Marxen et al., 2007; Brand-Williams, 1995).

În scopul determinării activității antiradicalice a diferitor probe (alimente, materie primă vegetală sau microalgă) au fost elaborate un șir de variante

care diferă după concentrația radicalului DPPH, solventul aplicat, conținutul amestecului reactant, durata reacției de reducere a radicalului.

Marea diversitate de modificări este confirmată prin mulțimea denumirilor atribuite testului DPPH: activitatea de reducere a radicalilor, activitatea antioxidantă, activitatea antiradicalică, capacitatea antioxidantă/antiradicalică, DPPH metodă/test, conținutul antioxidant, decolorarea radicalului DPPH. Cele mai uzuale denumiri pentru testul dat sunt determinarea activității antioxidante sau antiradicalice, iar denumirea corectă a testului este cea care corespunde mecanismului de reacție. Valorile testului DPPH depind de natura probelor, solventul utilizat la extragere, temperatura și durata extragerii. Solvenții frecvent utilizați la extragere sunt metanolul și etanolul. Concentrația radicalului DPPH este cuprinsă în limitele 0,05mM - 1,5M (Gupta 2013, 2007; Rudi 2010; Kim, 2002; Miller, 2000), iar durata reacție de reducere a radicalului DPPH variază între 1 min (Sroka, 2005) și 240 min (Miller, 2000). Activitatea antiradicalică este exprimată în % inhibiție radical sau echivalent acid ascorbic, tocoferol, trolox, BHA.

Principiul metodei:

Radicalul DPPH (1,1-difenil-2-picrililhidrazil) de culoare violetă, utilizat în calitate de substrat, este redus prin adăugare de atomi de hidrogen cu obținerea de 1,1 difenil-2-picrilhidrazină de culoare galbenă. Densitatea optică maximală a soluțiilor radical și radical redus se determină la 517 nm.

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;

5. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;
6. Termostat cu intervalul de temperatură de +5⁰C peste temperatura mediului+100⁰C.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută ± 0,02 ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml;
3. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. 1,1-difenil-2-picrililhidrazil (DPPH), grad puritate >97%;
2. Etanol absolut 96% pentru uz extern;
3. Metanol, grad puritate >99,8%;
4. Acid ascorbic, C₆H₈O₆, grad puritate >99%;
5. Solvent (alcool etilic de 55%; alcool etilic de 96%; acetona (C₃H₆O)).

Prepararea reagenților:

1. Soluția etanolică DPPH radical de 0,05 mM. 2 mg reagent DPPH (masă uscată) se dizolvă în 1 ml metanol. Se adaugă solventul corespunzător și amestecul se trece cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Volumul se aduce la cotă cu solventul selectat. Soluția DPPH este transparentă și de culoare violetă. În cazul aplicării acetonei în calitate de solvent se omite etapa de solubilizare (prealabilă) în metanol a radicalului DPPH.

În calitate de solvent se utilizează alcoolul etilic de 55% pentru probele hidrice și hidro - etanolic; alcoolul etilic de 96% pentru probele etanolic; acetona pentru uleiuri.

Standardizarea reagentului DPPH radical:

Se determină absorbanta soluției DPPH radical la 517 nm. Pentru a obține absorbanta de 0,64-0,66 se utilizează etanolul. În calitate de probă oarbă se utilizează etanolul. Reagentul DPPH se standardizează în dependență de tipul probelor.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru testul antioxidant și 3 eprubete Eppendorf pentru obținerea extractelor. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Prepararea extractelor (În mod similar procedurii descrise pentru Testul ABTS).*

Determinarea activității antioxidante (antiradicalice):

1. *Prepararea soluției de lucru DPPH.* Soluția de lucru DPPH se prepară în ziua realizării testului. Se utilizează aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului.

2. *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 radical DPPH la care se adaugă 0,1 ml probă. Probele se agită și se supun incubării la întuneric la temperatura camerei, timp de 30 - 60 min, în dependență de natura lor. Timpul se determină experimental.

Se determină densitatea optică a probelor la 517 nm.

3. *Prepararea probei oarbe.* Se prepară amestecul din 0,1 ml extract în care se determină activitatea antioxidantă și 3,0 ml solvent, în dependență de tipul extractului. Probele obținute sunt utilizate în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

4. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru a construi curba de calibrare se prepară (în triplicat), în eprubete gradate de 10 ml se prepară amestecurile de soluție acid ascorbic cu concentrația de 0,01 mg/ml și apă distilată (Tabelul 3).

Tabelul 3. Prepararea soluțiilor de acid ascorbic pentru realizarea curbei de calibrare

<i>Soluție de acid ascorbic cu concentrația de 0,01mg/ml, ml</i>	<i>Apă distilată, ml</i>	<i>Concentrația acidului ascorbic, mg/ml</i>
0,1	0,8	0,001
0,2	0,8	0,002
0,3	0,7	0,003
0,4	0,6	0,004
0,5	0,5	0,005
0,6	0,4	0,006
0,7	0,3	0,007

Se prepară amestecurile reactante. În eprubete din sticlă de 10 ml se amestecă 3 ml soluție de lucru DPPH și 0,1 ml soluție acid ascorbic de concentrațiile de la 0,001 mg/ml până la 0,07 mg/ml. Probele se agită și se supun incubării la întuneric la temperatura camerei, timp de 30 min. În calitate de probă oarbă se utilizează apa distilată. Se măsoară absorbanta la 517 nm. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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. Formula de calcul este $K=C/A_{517}$, unde C este concentrația acidului ascorbic în probe, mg/ml, A - absorbanta probei la 517 nm. Curba de calibrare se construiește de fiecare dată când sunt preparați reagenții. Intervalul linear pentru curba de calibrare este de 0,01 - 0,07 mg acid ascorbic.

5. *Calculul activității antioxidante în probe se efectuează :*

1) În baza coeficientului determinat experimental, cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{517} \cdot K$, unde C - concentrația de acid ascorbic în probă, mg/ml;

A_{517} - absorbanța la 517 nm; K - coeficientul de recalcul (în mg acid ascorbic/ml) determinat din curba de calibrare. În cazul dat absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

2) Absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile activității antioxidante în mg acid ascorbic la 1 ml probă sau mg, g biomasă. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

3) Activitatea antioxidantă poate fi exprimată în % inhibiție DPPH, care se calculează conform formulei: % Inhibiție $= (A_{t=0} - A_{t=x \text{ min}}) / A_{t=0} \cdot 100$, unde $A_{t=0}$ - absorbanta reagentului DPPH, $A_{t=x \text{ min}}$ - absorbanta amestecului reactiv după expirarea timpului de incubare, în min.

Raportarea testului:

Testul de determinare a activității antiradicalice cu aplicarea radicalului non - biologic DPPH în calitate de substrat este utilizat pentru aprecierea capacității antiradicalice în baza extractelor din biomasă cianobacteriilor și microalgelor sau a unor produse. Capacitatea antiradicalică a extractelor etanolică depinde de conținutul în biomasă a componentelor capabile să reducă radicalul non - biologic DPPH în baza mecanismului donor de protoni. Rezultatele testului antiradicalic DPPH pot fi anunțate numai cu specificarea procedurii de determinare. Testul antiradicalic DPPH este considerat a fi pentru uz intern.

3.3 Determinarea activității antioxidante prin metoda reducerii reagentului fosfomolibdenic

Metoda dată se utilizează pentru compararea activității antioxidante a complexelor de antioxidanți naturali liposolubili și hidrosolubili, obținuți prin extragerea lor în diferiți solvenți. Utilitatea metodei date constă în posibilitatea testării antioxidanților solubili în solvenți foarte variați cu grad diferit de polaritate.

Principiul metodei:

Activitatea antioxidantă a probei se determină indirect, spectrofotometric, în baza reacției de oxido - reducere cu reducerea Mo(VI) în Mo(V) cu formarea complexului $PO_4^{3-}/Mo(V)$ de culoare verde și are la bază transferul de electroni produs în mediul acid (Prieto, 1999).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei;
2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;
6. Termostat cu intervalul de temperatură de $+5^{\circ}C$ peste temperatura mediului..... $+100^{\circ}C$.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml;
3. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;

5. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Amoniu heptamolibdat tetrahidrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, chimic pur;
2. Fosfat de sodiu (Na_3PO_4), chimic pur;
3. Acid sulfuric concentrat (H_2SO_4), chimic pur;
4. Acid ascorbic, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, grad puritate >99%;
5. Solvent (alcool etilic de 55%; alcool etilic de 96%; acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)).

Prepararea reagenților:

1. **Soluția de acid sulfuric de 0,6M.** 33 ml acid sulfuric concentrat (94,6%) se dizolvă în 80 ml apă distilată. După răcirea amestecului soluția se trece într-un balon cotat de 100 ml. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă distilată.
2. **Soluția de fosfat de sodiu de 28 mM.** 1,148 g fosfat de sodiu se amestecă cu 60 ml apă distilată. Soluția se trece într-un balon cotat de 100 ml și volumul se aduce la cotă cu apă distilată.
3. **Soluția de molibdat de amoniu de 4 mM.** 1,236 g molibdat de amoniu se amestecă cu 60 ml apă distilată. Soluția se trece într-un balon cotat de 100 ml și volumul se aduce la cotă cu apă distilată.
4. **Reagentul fosfomolibdenic** se prepară din acid sulfuric de 0,6 M, fosfat de sodiu de 28 mM și molibdat de amoniu de 4 mM. Reagentul fosfomolibdenic se formează prin amestecarea soluției de molibdat de amoniu cu acidul sulfuric, la care se adaugă fosfatul de sodiu. Volumul se aduce cu apă la 500 ml. Se obține o soluție transparentă lipsită de careva sediment. Termenul de valabilitate este nelimitat.
5. **Soluția de acid ascorbic cu concentrația de 10 mg/ml.** 100 mg acid ascorbic se dizolvă în 50 ml apă distilată. Soluția se trece într-un balon cotat de 100 ml și volumul se aduce la cotă cu apă distilată.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete pentru testul antioxidant și 3 eprubete Eppendorf pentru obținerea extractelor. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Prepararea extractelor hidrice.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml se introduc câte 1,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) și se centrifughează la 11000 g timp de 10 min. Supernatantul obținut se colectează în alte eprubete Eppendorf. Extractul hidric obținut este de culoarea specifică conținutului pigmentilor hidrosolubili. Se păstrează sub formă congelată.

Determinarea activității antioxidante:

1. *Pregătirea probelor de lucru.* Se prepară amestecul reagent în eprubete din sticlă cu volumul de 10 ml. Amestecul reagent constă din 2,7 ml soluție reagent fosfomolibdenic la care se adaugă 0,3 ml probă. Probele se agită și se supun incubării la temperatura 95⁰C, timp de 90 min.

După expirarea timpului de incubare, probele se răcesc până la temperatura camerei și se determină absorbanta la 695 nm.

2. *Prepararea probei oarbe.* În calitate de probă oarbă se utilizează reagentul fosfomolibdenic.

3. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru a construi curba de calibrare în eprubete gradate de 10 ml se prepară (în triplicat) amestecurile de soluție de acid ascorbic cu concentrația de 10 mg/ml și apă distilată (Tabelul 4).

**Tabelul 4. Prepararea soluțiilor de acid ascorbic
pentru realizarea curbei de calibrare**

<i>Soluție de acid ascorbic cu concentrația de 10 mg/ml, ml</i>	<i>Apă distilată, ml</i>	<i>Concentrația acid ascorbic, mg/ml</i>
0,1	0,9	1,0
0,2	0,8	2,0
0,3	0,7	3,0
0,4	0,6	4,0
0,5	0,5	5,0
0,6	0,4	6,0

Se prepară amestecurile reactante. În eprubete din sticlă de 10 ml se amestecă 2,7 ml soluție reagent fosfomolibdenic și 0,3 ml soluție acid ascorbic de concentrațiile de la 1,0 mg/ml până la 6,0 mg/ml. Probele se agită, după care se supun incubării la temperatura 95⁰C timp de 90 min. După expirarea timpului de incubare probele se răcesc până la temperatura camerei și se determină absorbanta la 695 nm.

Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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 calcularea cantitativă. Formula de calcul este $K=C/A_{695}$, unde C este concentrația acidului ascorbic în probe, mg/ml, A_{695} - absorbanta probei la 695 nm. Curba de calibrare se construiește de fiecare dată când sunt preparați reagenții. Intervalul liniar pentru curba de calibrare este de 1,0 la 6,0 mg/ml acid ascorbic.

4. Calculul activității antioxidante în probe se efectuează:

1) În baza coeficientului determinat experimental cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{517} \cdot K$, unde C - concentrația de acid ascorbic în probă, mg/ml; A_{695} - absorbanta la 695 nm; K - coeficientul de recalcul (în mg acid ascorbic/ml) determinat din curba de calibrare. În cazul dat, absorbanta

probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

2) Absorbanța probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile activității antioxidante în mg acid ascorbic la 1,0 ml probă sau mg, g biomasă. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

3.4 Metoda reducerii complexului ferocianurii ferice în ferocianura feroasă

Metoda de determinare a puterii de reducere cu utilizarea hexacianoferratului de potasiu în calitate de indicator și a clorurii de fier (III) în calitate de substrat este un test analitic simplu și ușor de realizat. Unul din factorii care poate fi considerat ca dezavantaj este adaptarea metodei date la materialul biologic testat. Se va lua în considerație, în primul rând, raportul dintre volumul substratului FeCl_3 și volumul probelor biologice, care sunt active din punct de vedere a puterii de reducere.

Metoda determinării puterii de reducere este similară testului antioxidant cu utilizarea radicalului ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) după mecanismul reacției redox. Se consideră, că în cazul reactivității joase a unor componente fenolice, pentru care durata reacției este peste 6 min, testul de reducere a Fe(III) este mai avantajos. În cazul cianobacteriilor și microalgelor, capacitatea de reducere a fierului este dependentă de componentele biomasei și nu a extractelor din biomasă.

Principiul metodei:

Metoda are la bază reducerea complexului ferocianurii ferice în ferocianura feroasă de *albastru de Berlin*. Hexacianoferatul de potasiu formează cation stabil $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, care poate detecta fierul (II). Reducerea Fe(III) se produce de către componentele biomasei de spirulină și forma redusă a fierului este detectată de cationii stabili de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ cu formarea complexului $\text{Fe}^3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ de culoare verde albastră (Dorman, 2003; Oyaizu, 1987).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbantei;
2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;
6. Termostat cu intervalul de temperatură de $+ 5^{\circ}\text{C}$ peste temperatura mediului.....+ 100°C .

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul 10 ml;
3. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Ferocianura de potasiu $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, grad puritate $>99\%$;
2. Sodiu fosfat dibazic dihidrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, grad puritate 98%;
3. Sodiu fosfat monobazic monohidrat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, grad puritate 98%;

4. Clorură de fier FeCl_3 , grad puritate >99%;
5. Acid tricloracetic CCl_3COOH , grad puritate >99%;
6. Acid ascorbic, grad puritate >99%.

Prepararea soluțiilor:

- 1. Soluția de sodiu fosfat dibazic dihidrat de 0,2M (Soluția A).** Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Volumul se aduce la cotă cu apă.
- 2. Soluția de sodiu fosfat monobazic monohidrat de 0,2M (Soluția B).** Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Volumul se aduce la cotă cu apă.
- 3. Soluția tampon fosfat de 0,1M, pH 6,6** se obține prin amestecul soluțiilor sodiu fosfat dibazic dihidrat 0,2M (soluția A) și sodiu fosfat monobazic monohidrat 0,2M (soluția B). Într-un balon cotat de 100 ml se amestecă 18,75 ml soluție A cu 31,25 ml soluție B cu diluarea ulterioară până la volumul de 100 ml cu apă distilată.
- 4. Soluția de hexacianoferat de potasiu de 1%.** Pentru aceasta într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml se dizolvă 1 g $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ cu apă distilată. Volumul se aduce la cotă cu apă.
- 5. Soluția de clorură de fier (III) 0,1%.** Într-un balon cotat de 100 ml se dizolvă 100 mg FeCl_3 cu apă distilată și volumul se aduce la cotă cu apă.
- 6. Soluția de acid tricloracetic de 10%.** Într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml se dizolvă 10 g CCl_3COOH cu apă distilată. Volumul se aduce la cotă cu apă.
- 7. Soluția stoc de acid ascorbic cu concentrația de 0,01%.** Într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml se introduc 10 mg acid ascorbic și se aduce volumul la cotă cu apă distilată.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare câte 3 eprubete. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Pregătirea probelor experimentale.* Proba de biomasă standardizată (1 ml, 10 mg/ml) se centrifughează la 11000 rpm în eprubete Eppendorf (2,0 ml). După centrifugare supernatantul se înlătură.

Determinarea puterii de reducere:

1. *Pregătirea probelor de lucru.* În eprubete se mixează 10 mg biomasă cu 5 ml soluție tampon fosfat 0,1M, pH 6,6 și cu 0,5 ml soluție hexacianoferrat de potasiu 0,1%. Amestecul reactant se incubează la 50°C timp de 20 min. După incubare la amestec se adaugă 0,5 ml acid tricloracetic de 10%. Amestecul se centrifughează la 2200 rpm.

Se colectează 1,5 ml supernatant și se adaugă 0,2 ml soluție clorură de fier 0,1% și 2 ml apă distilată. Se măsoară absorbanta la 700 nm.

2. *Pregătirea probei de referință.* Se amestecă 5 ml soluție tampon fosfat 0,1M, pH 6,6 și cu 0,5 ml soluție hexacianoferrat de potasiu 0,1%. Amestecul se incubează la 50°C timp de 20 min. După incubare se adaugă 0,5 ml acid tricloracetic 10%. La 1,5 ml amestec se adaugă 0,2 ml soluție de clorură de fier 0,1% și 2 ml apă distilată. Proba obținută este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

3. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru a construi curba de calibrare, în eprubete gradate de 10 ml se prepară amestecurile de soluție de acid ascorbic de 0,01% și apă distilată (Tabelul 5).

În eprubete din plastic de 10 ml se mixează 0,1 ml soluție de acid ascorbic de 0,01% cu 0,5 ml soluție tampon fosfat de 0,1M, pH 6,6 și 0,5 ml soluție de hexacianoferrat de potasiu de 0,1%. Amestecurile se incubează la temperatura de 50°C timp de 20 min.

Tabelul 5. Prepararea soluțiilor acid ascorbic pentru curba de calibrare

<i>Soluția de acid ascorbic de 0,01%, μl</i>	<i>Apă distilată, μl</i>	<i>Concentrația acidului ascorbic, μg/ml</i>
100	900	10
200	800	20
300	700	30
400	600	40
500	500	50
600	400	60
700	300	70
800	200	80
900	100	90
1000	0	100

După perioada de incubare, la probe se adaugă 0,5 ml acid tricloracetic de 10%, 0,2 ml soluție de clorură de fier de 0,1% și 2 ml apă distilată. Se măsoară absorbanta la 700 nm. Intervalul liniar pentru curba de calibrare este de 10 - 100 μ g/ml acid ascorbic. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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. Formula de calcul este $K=C/A_{700}$, unde C este concentrația acidului ascorbic în probe, μ g/ml, A_{700} - absorbanta probei la 700 nm. Intervalul liniar pentru curba de calibrare este de 10 - 100 μ g acid ascorbic.

4. Calculul puterii de reducere se efectuează:

1) În baza coeficientului determinat experimental, cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{700} \cdot K$, unde C - concentrația acidului ascorbic în probă, μ g/ml; A_{700} - absorbanta la 700 nm; K - coeficientul de recalcul (în μ g acid ascorbic/ml) determinat din curba de calibrare. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

2) Absorbanța probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile echivalentului acidului ascorbic în $\mu\text{g/ml}$. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente

Exprimarea rezultatelor:

Puterea de reducere poate fi exprimată în valori relative (*absorbanța*) sau în echivalent acid ascorbic în $\mu\text{g/g}$, mg/ml , mg/mg biomasă.

Raportarea testului:

Metoda de determinare a puterii de reducere a biomasei cu utilizarea hexacianoferratului de potasiu în calitate de detector al ionilor de Fe(II), rezultați prin reducerea Fe(III) de către componentele biomasei poate corela cu conținutul proteinelor și a hidraților de carbon din biomasă. Rezultatele testului de determinare a puterii de reducere pot fi anunțate numai cu specificarea procedurii de determinare.

3.5 Determinarea conținutului peroxidului de hidrogen în biomasa cianobacteriilor și microalgelor prin metoda oxidării iodurii de potasiu cu peroxid de hidrogen

Peroxidul de hidrogen este produs în mod normal în rezultatul proceselor biochimice în celulă, dar și în rezultatul unui stres oxidativ. Cuantificarea conținutului de peroxid de hidrogen este importantă pentru numeroase studii de stimulare a proceselor biosintetice și de acumulare a metalelor în biomasă. Sunt aplicate metode spectrofotometrice, de chemiluminiscență și electrochimice care au la bază reacții enzimaticе și de oxido - reducere. Metoda dată are la bază reacția de oxidare a iodurii de potasiu cu formarea iodidului care dă o nuanță gălbuie soluției. Absorbanța sistemului reactant

poate fi măsurată la lungimile de undă de 285 nm, 350 nm sau 390 nm. Pentru materialul biologic luat în studiu se determină în mod particular maximumul de absorbție.

Principiul metodei:

Metoda are la bază principiul oxidării iodurii de potasiu cu peroxid de hidrogen în mediu acid cu formarea iodului triiodid (I_3^-) care se determină la lungimea de undă 350 nm (Junglee, 2014).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160 g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
4. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;
5. Termostat cu intervalul de temperatură de $+ 5^{\circ}C$ peste temperatura mediului..... $+ 100^{\circ}C$.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul 10 ml;
3. Eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml;
4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Acid tricloracetic CCl_3COOH (TCA), grad puritate $>99\%$;
2. Sodiu fosfat dibazic dihidrat $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, grad puritate 98%;
3. Sodiu fosfat monobazic monohidrat $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, grad puritate 98%;
4. Iodură de potasiu KI, grad puritate 98%;

5. Peroxid de hidrogen, soluție 3%, farmaceutic.

Prepararea soluțiilor:

1. Soluția de acid tricloracetic de 0,1%. 100 mg (masă uscată) CCl_3COOH se trece într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml și se dizolvă în apă distilată. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.

2. Soluția de sodiu fosfat dibazic dihidrat de 0,2 M (Soluția A) 100 ml. Într-un balon cotat de 100 ml se dizolvă 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.

3. Soluția de sodiu fosfat monobazic monohidrat de 0,2 M (Soluția B) 100 ml. Într-un balon cotat de 100 ml se dizolvă 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.

4. Soluția tampon fosfat de 0,1 M, pH 7,0. Într-un balon cotat de 100 ml se amestecă 30,5 ml soluție A cu 19,5 ml soluție B. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.

5. Soluția de iodură de potasiu de 1 M. Într-un balon cotat de 100 ml se dizolvă 16,6 g KI cu apă distilată. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.

6. Soluția standard de apă oxigenată. Cantitatea de 1 μl soluție peroxid de hidrogen (3%, farmaceutic) se amestecă cu 10 ml apă distilată.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Pregătirea probelor experimentale.* Proba de biomasă standardizată (1 ml, 10 mg/ml) se centrifughează la 11000 rpm în eprubete Eppendorf (2,0 ml). După centrifugare supernatantul se înlătură, iar biomasa sedimentată se congelează. În mod identic se prepară biomasa pentru proba oarbă.

Determinarea peroxidului de hidrogen în probe:

1. *Pregătirea probelor de lucru.* În eprubete pentru centrifugare biomasa congelată (10 mg) se amestecă cu 1,0 ml soluție acid tricloracetic (0,1%), 1,0 ml soluție tampon fosfat (0,1M, pH-7,0) și 1,0 ml soluție iodură de potasiu (1M). Proba se răcește la 4°C timp de 10 min, după care se centrifughează la 2100 rpm timp de 15 min. După centrifugare supernatantul este colectat și se incubează la 22°C timp de 20 min. Se măsoară absorbanta la lungimea de undă 350 nm.

2. *Pregătirea probei de referință.* Proba de biomasă standardizată (1 ml, 10 mg/ml) se centrifughează la 11000 rpm în eprubete Eppendorf (2,0 ml). După centrifugare supernatantul se înlătură, iar biomasa sedimentată se congelează. Biomasa congelată (10 mg) se amestecă cu 1 ml soluție acid tricloracetic (0,1%), 1 ml soluție tampon fosfat (0,1M, pH-ul 7,0) și 1 apă distilată. Proba se răcește la 4°C timp de 10 min, după care se centrifughează la 2200 rpm 15 min. După centrifugare supernatantul este colectat și se incubează la 22°C timp de 20 min. Proba obținută este utilizată în calitate de referință la măsurarea probelor experimentale.

3. *Construirea curbei de calibrare.* Pentru a construi curba de calibrare, în eprubete gradate de 10 ml se prepară amestecurile de soluție standard de peroxid de hidrogen și apă distilată (Tabelul 6).

**Tabelul 6. Prepararea soluțiilor de peroxid de hidrogen
pentru curba de calibrare**

<i>Soluție de peroxid de hidrogen, μl</i>	<i>Apă distilată, μl</i>	<i>Concentrația peroxidului de hidrogen, $\mu\text{g/ml}$</i>
500	500	1500
330	670	1000
250	750	750
200	800	600
167	833	500
143	857	429
111	889	333
100	900	300
90	910	273

La soluțiile de peroxid de hidrogen, preparate din soluția standard de peroxid de hidrogen se adaugă soluție acid tricloracetic (1,0 ml, 0,1%). Amestecurile obținute se agită. În continuare, la 1 ml amestec se adaugă 1 ml soluție tampon fosfat (0,1M, pH 7,0) și 1 ml soluție iodură de potasiu (1M). Proba oarbă constă din amestecul de acid tricloracetic (1,0 ml, 0,1%) cu soluția tampon fosfat (1 ml, 0,1M, pH-7,0) și apă distilată (2 ml).

Se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 350 nm. Se utilizează aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. 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. Formula de calcul este $K=C/A_{350}$, unde C este concentrația peroxidului de hidrogen în probe, $\mu\text{g/ml}$, A_{350} - absorbanta probei la 350 nm. Intervalul liniar pentru curba de calibrare este de 273 - 1500 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2$.

4. Calculul conținutului de H_2O_2 în probe se efectuează:

1) În baza coeficientului determinat experimental cu aplicarea formulei de calcul: $C = A_{350} \cdot K$, unde C - concentrația H_2O_2 în probă, $\mu\text{g/ml}$; A_{350} - absorbanta la 350 nm; K - coeficientul de recalcul (în $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{ml}$) determinat din curba de calibrare. În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se

înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

2) Absorbanța probelor experimentale se înregistrează cu aplicația QUANTITATIVE WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, unde valoarea coeficientului de calcul se introduce în formula programului. Se obțin valorile conținutului de peroxid de hidrogen în $\mu\text{g/ml}$. Calculul statistic este realizat în baza programelor de calcul existente.

Exprimarea rezultatelor:

Conținutul peroxidului de hidrogen în biomasă se calculează cu utilizarea coeficientului de extincție a peroxidului de hidrogen și se exprimă în $\mu\text{g/g}$ biomasă; $\mu\text{g/mg}$ biomasă.

Raportarea testului:

Determinarea acumulării peroxidului de hidrogen este o metodă indirectă în stabilirea nivelului radicalilor liberi în biomasă. Rezultatele testului conținutului peroxidului de hidrogen pot fi anunțate cu specificarea procedurii de determinare și a lungimii de undă pentru spectrofotometrie.

3.6 Determinarea capacității de reducere a radicalului oxidului nitric

Oxidul nitric fiind produsul proceselor vitale este omniprezent. Astfel, oxidul nitric este un radical specific și utilizarea lui în calitate de substrat pentru reacțiile antioxidante facilitează demonstrarea utilității antioxidantului testat pentru uzul farmaceutic și nutraceutic.

Principiul metodei:

Metoda constă în determinarea nivelului de producere a radicalului oxidului nitric generat de nitroprusiatul de sodiu. Oxidul nitric interacționează

cu oxigenul și formează nitriți, care sunt determinați spectrofotometric cu utilizarea reagentul Griess. Formarea cromoforului are loc în rezultatul diazotizării nitritului cu sulfanilamidă și cuplarea lui cu naftiletilediamină (Marcocci, 1994).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160g, eroarea de măsurare de până la 0,0001 g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm.
6. Termostat cu intervalul de temperatură de + 5°C peste temperatura mediului.....+ 100°C.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml
2. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul 10 ml;
3. Pahar chimic cu volumul de 200 ml;
4. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Nitrofericianid de sodiu dihidrat ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), grad puritate >99%;
2. Dihidrofosfat de potasiu KH_2PO_4 , chimic pur;
3. Hidroxid de sodiu, chimic pur;
4. Reagentul Griess (1% sulfanilamidă, 2% acid fosforic și 0,1% naftiletilediamină dihidroclorid).

Prepararea soluțiilor

- 1. Soluția de dihidrofosfat de potasiu de 0,1M.** 1,36 g KH_2PO_4 se dizolvă în 50 ml apă distilată. Soluția obținută se trece într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.
- 2. Soluția de hidroxid de sodiu de 0,1M.** 0,4 g NaOH se dizolvă în 50 ml apă distilată. Soluția obținută se trece într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.
- 3. Soluția tampon fosfat, pH 7,4.** Într-un pahar de 200 ml se amestecă 100 ml 0,1M KH_2PO_4 cu 78,2 ml 0,1M NaOH. Se obține soluția tampon cu pH-ul 7,4.
- 4. Soluția de nitroprusiat de sodiu de 10mM.** Soluția de nitroprusiat de sodiu se prepară imediat înaintea efectuării testului, prin dizolvarea a 0,262 g nitrofericianid de sodiu dihidrat în 60 ml soluție tampon fosfat, pH 7,4. Soluția se trece într-un balon cotate cu capacitatea de 100 ml. Volumul soluției se aduce la cotă cu soluția tampon fosfat.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru a asigura calculul statistic se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Pregătirea probelor experimentale.* Capacitatea de a reduce radicalul oxidului nitric se determină în extractele hidrice și hidro - etanolice.

a) *Prepararea extractelor hidrice.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml se iau câte 1,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) și se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Supernatantul obținut se colectează în alte eprubete Eppendorf. Extractul hidric obținut se diluează cu apă de 10 ori;

b) *Prepararea extractelor hidro - etanolice.* În eprubete Eppendorf cu volumul de 2,0 ml se iau a câte 1,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) și se

centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Supernatantul obținut se înlătură. La biomasa sedimentată se adaugă 1 ml alcool etilic de 50%. Amestecul obținut se agită timp de 120 min. Eprubetele se centrifughează la 11000 rpm timp de 5 min. Extractul obținut se diluează de 10 ori cu alcool etilic de 50%.

3. *Pregătirea probei oarbe.* În calitate de probă de referință este utilizată apa distilată.

Determinarea capacității de reducere a radicalului oxidului nitric:

1. *Pregătirea probelor de lucru.* În eprubete din sticlă se introduc 0,5 ml extract diluat, la care se adaugă 0,5 ml soluție nitroprusiat de sodiu 10mM. Probele se incubează la 25°C timp de 150 min. După expirarea perioadei de incubare la probe se adaugă 2,0 ml reagent Griess (1% sulfanilamidă, 2% acid fosforic și 0,1% naftiletilediamină dihidroclorid). Se măsoară absorbanta la 542 nm.

2. *Pregătirea probei control.* În calitate de probă control se folosește amestecul din 0,5 ml nitroprusiat de sodiu 10mM și 0,5 ml apă distilată. Probele se incubează la 25°C timp de 150 min. După expirarea perioadei de incubare la probe se adaugă 2,0 ml reagent Griess. Se măsoară absorbanta la 542 nm.

În cazul dat, absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului, iar calculul cantitativ și calculul statistic este realizat în Excel sau într-un alt program de calcul;

Reducerea formării oxidului nitric se exprimă în % inhibiție NO și se calculează conform formulei: % Inhibiție = $(A_{\text{contr}} - A_{\text{pr}}) / A_{\text{contr}} \cdot 100$, unde A_{contr} - absorbanta probei control, A_{pr} - absorbanta probei experimentale.

3.7 Determinarea capacității antioxidante în baza metodei TBARS

Capacitatea complexelor antioxidante de a reduce radicalii și de a preveni oxidarea poate fi verificată prin aplicarea metodei de determinare a produselor degradării acidului tiobarbituric. În acest scop, în calitate de substrat ușor oxidabil se utilizează câteva tipuri de uleiuri vegetale lipsite de adaos antioxidant. În calitate de antioxidant se utilizează extractul etanolic obținut în baza biomasei cianobacteriilor și microalgelor.

Principiul metodei:

Produsele degradării oxidative a acizilor grași sunt stabilite prin metoda determinării cantității dialdehidei malonice acumulate, în baza substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric (TBARS).

Echipament:

1. Spectrofotometru VIS pentru înregistrarea absorbanței;
2. Balanță analitică cu limita maximală de cântărire 160g, eroarea de măsurare $\pm 0,0001$ g;
3. Centrifugă de laborator cu factorul de separare 1500 - 5000 RCF;
4. Centrifugă de laborator cu factorul de separare $\leq 31,514$ RCF;
5. Agitator orbital cu intervalul de viteză de 30 - 500 rpm;
6. Termostat cu intervalul de temperatură de $+ 5^{\circ}\text{C}$ peste temperatura mediului..... $+ 100^{\circ}\text{C}$.
7. Baie de apă.

Veselă de laborator:

1. Balon volumetric cu volumul de 100 ml cu eroarea absolută $\pm 0,02$ ml;
2. Eprubete pentru centrifugare gradate din plastic cu dop, cu volumul de 10 ml;
3. Eprubete pentru centrifugare din sticlă cu volumul de 10 ml. Pentru a exclude evaporarea apei din eprubetă în timpul hidrolizei, se folosesc capace speciale pentru procesul de fierbere;

4. Pahar chimic cu volumul de 100 ml;
5. Baghetă din sticlă.

Reagenți:

1. Acid tricloracetic (CCl_3COOH), grad puritate >99%;
2. Acid tiobarbituric ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$), grad puritate 98%;
3. Uleiuri vegetale.

Prepararea soluțiilor:

1. **Soluția de acid tricloracetic de 10%.** 20 g (masă uscată) CCl_3COOH se trece într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml și se dizolvă în apă distilată. Volumul soluției se aduce la cotă cu apă.
2. **Soluția de acid tiobarbituric de 0,76%.** 760 mg acid tiobarbituric se trece într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml. Se adaugă circa 50 ml acid tricloracetic de 10% și se plasează pe baia de apă (90°C) până la dizolvarea completă, apoi volumul se aduce la cotă cu acid tricloracetic de 10%. Soluția se prepară în ziua utilizării. Volumul de lucru al acidului tiobarbituric se calculează în baza numărului de probe.

Pregătirea pentru analiză:

1. *Pregătirea eprubetelor.* Pentru veridicitatea statistică se efectuează 3 măsurări paralele. Prin urmare, pentru fiecare probă analizată sunt necesare 3 eprubete. Eprubetele sunt în prealabil numerotate.

2. *Prepararea extractelor etanolice.* În eprubete cu volumul de 10 ml se introduc câte 5,0 ml biomasă standardizată (10 mg/ml) și se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Supernatantul obținut se înlătură, iar la biomasa sedimentată se adaugă 5,0 ml alcool etilic. Amestecul obținut se agită timp de 120 min. Eprubetele se centrifughează la 11000 rpm timp de 10 min. Extractul obținut este de culoarea specifică conținutului pigmentilor solubili în etanol. Se păstrează la temperatura $+4^\circ\text{C}$.

3. *Pregătirea probelor experimentale.* În eprubete se iau câte 6 ml ulei vegetal la care se adaugă 3 ml extract etanolic. Pentru a spori incorporarea antioxidantilor, amestecul obținut se emulsionează prin agitare timp de 60 min. Amestecurile obținute se incubează la întuneric, la temperatura camerei pentru 24 ore. Restul de etanol se înlătură prin decantare.

4. *Pregătirea probei de referință.* În eprubete se introduc câte 6 ml ulei vegetal utilizat în varianta experimentală.

5. *Oxidarea uleiurilor.* Probele experimentale de ulei cu complex antioxidant și proba control de ulei sunt supuse oxidării în dulap la 100°C timp de 60 min. După expirarea timpului, probele se răcesc până la temperatura camerei.

6. *Pregătirea probelor pentru testul TBARS.* Din probele experimentale și proba control se iau câte 0,1 ml ulei la care se adaugă 3,0 ml acid tiobarbituric (0,76%). Amestecul reactant se incubează pe baia de apă la 95°C timp de 40 min. În continuare, probele se răcesc sub jet de apă rece și la necesitate se centrifughează la 11000 rpm timp de 7 min.

Determinarea conținutului de dialdehidă malonică:

1. *Pregătirea probelor experimentale.* În eprubete de sticlă se transferă supernatantul obținut în rezultatul centrifugării probelor supuse hidrolizei. Se înregistrează absorbanta probelor la lungimea de undă 535 nm. În calitate de probă oarbă se utilizează amestecul din care lipsește materialul biologic.

2. *Calculul conținutului cantitativ de dialdehidă malonică:*

Absorbanta probelor experimentale se înregistrează cu aplicația PHOTOMETRIC WORKSPACE din dotarea spectrofotometrului. Conținutul de dialdehidă malonică în probă se calculează cu utilizarea coeficientului de extincție a produsului complexului DAM-ATB: DAM echivalent (nM cm^{-1}) = $1000(A_{523}/155)$, unde A_{523} - absorbanta probei la 523 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.

Bibliografie:

1. BENETT, A., BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. In: *Journal of Cell Biology*. 1973, vol. 58(2), pp. 419-435. ISSN (online) 1540-8140.
2. 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.
3. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In: *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1995, vol. 28(1), pp. 25-30. ISSN 0023-6438.
4. BRYANT, D., et al. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: A model. In: *Archives of Microbiology*. 1979, vol. 123(2), pp. 113-127. ISSN (online) 1432-072X.
5. BULIMAGA, V., OLAN, O. *Procedeu de determinare cantitativă a exopolizaharidelor algale acide și sulfatate în lichidul cultural*. Brevet de invenție MD 230 Y, în: BOPI 6/2010.
6. CATHERINE, F., JUSTIN, L., IRWIN, A., FINKEL, Z. Methodological biases in estimates of macroalgal macromolecular composition. In: *Limnology and Oceanography: Methods*. 2017, vol. 15(7), pp. 618-630. ISSN (online) 1541-5856.
7. CHABROL, E., CHARONNET, R. Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides. In: *Presse Med.*, 1937, vol. 45, pp.1713-1714. DORMAN, H. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha species*, hybrids, varieties, and cultivars. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51(16), pp. 4563-4569. ISSN (online) 1520-5118.
8. FOLCH, J. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. In: *Journal of Biological Chemistry*. 1957, vol. 226(1), pp. 497-509. ISSN (online) 1083-351X.
9. 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
10. GUPTA, M., MAZUMDER, U., GOMATHI, P. Antioxidant and antimicrobial properties of *Galega purpurea* root. In: *Asian Journal of Plant Sciences*. 2007, vol. 6(3), pp. 533-537. ISSN (online) 1812-5697.
11. HODGES DM, DELONG JM, FORNEY F, PRANGE RK. Improved thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. In: *Planta*. 1999; 207:604-611.
12. 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.
13. INOUE, L.S., LOTUFO, G.R. Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods. In: *Talanta*. 2006, vol. 70, nr. 3, pp. 584-587.

14. JUNGLEE, S., URBAN, L., SALLANON, H., LOPEZ-LAURI, F. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. In: *American Journal of Analytical Chemistry*. 2014, vol. 5(11), pp. 730-736. ISSN (online) 2156-8278.
15. KATES, M. Separation of lipid mixtures. In: *Techniques of Lipidology*. US: Elsevier, 1988, p. 186-278.
16. KIM, J., et al. The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2002, vol. 23(5), pp. 661-662. ISSN (online) 1229-5949.
17. LIEBENBERG, L. Evaluation of biologically active compounds in *Coleonema album*. Ph.D. thesis, University of Johannesburg, South Africa, 2004.
18. 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.
19. MAGALHAES, M., et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. In: *Analytica chimica acta*. 2008, vol. 613(1), pp 1–19. ISSN (online) 1873-4324.
20. MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract Egb 761. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994, vol. 201(2), pp. 748-755. ISSN (online) 1090-2104.
21. 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.
22. MARXEN, K. et al.. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. In: *Sensors*. 2007, vol.7(10), pp. 2080-2095. ISSN 1424-8220.
23. 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, pp. 1387–1395. ISSN 1590-4261.
24. MILLER, H., et al. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. In: *Journal of the American College of Nutrition*. 2000, vol. 19(3), pp. 312S-319S. ISSN (online) 1541-1087.
25. MISCU, V., CEPOI, L., RUDI, L., COJOCARI, A., RUDIC, V. Procedeu de extragere a astaxantinei din biomasă de *Haematococcus pluvialis*. Brevet 146 Z 2010.02.28. In: BOPI nr. 2/2010.
26. MISCU, V., CEPOI, L., RUDI, L., COJOCARI, A., RUDIC, V. Procedeu de obținere a preparatului uleios de astaxantină. Brevet 132 Z 2010.01.31. In: BOPI nr. 1/2010.
27. OYAIZU, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. In: *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*. 1986, vol. 44, pp. 307-315.
28. 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.
29. PASOW, U., ALLDREDGE, A. A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). In: *Limnology and Oceanography*. 1995, vol. 40(7), pp.1236-1335. ISSN 1541-5856.

30. PRIETO, P., PINEDA, M., AQUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. In: *Analytical Biochemistry*. 1999, vol. 269(2), pp. 337-341. ISSN 0003-2697.
31. RAMUS, J. Alcian blue: a quantitative aqueous assay for algal acid and sulfated polysaccharides. In: *Journal Phycology*. 1977, vol. 13(4), pp.345-348. ISSN (online) 1529-8817.
32. 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.
33. RODRIGUEZ-AMAYA, D. Guide to carotenoid analysis in foods. Washington: International Life Sciences Institute, 2001. 65 p. ISBN 1-57881-072-8.
34. RUDI, L., CEPOI, L., MISCU, V., CHIRIAC, T., COJOCARI, A. SADOVNIC, D., RUDIC V. Aprecierea activității antioxidante și antiradicalice a extractelor din *Porphyridium cruentum* prin aplicarea metodelor non-specifice. In: Buletinul Academiei de științe a Moldovei. Științele vieții. 2010, vol, 3, nr. 321, pp. 114-120.
35. RUDI, L., CEPOI, L., MISCU, V., CHIRIAC, T., VALUȚĂ, A. SADOVNIC, D., RUDIC V., DJUR, S. Determinarea dependenței corelaționale dintre valorile testului ABTS și conținutul de carotenoizi în extractele etanolice din biomasa algei verzi *Haematococcus pluvialis*. In: Buletinul Academiei de științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, vol, 3, nr. 321, pp. 146-153.
36. RUDIC, V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău: Știința, 1993. 140 p.
37. RUDIC, V., GUDUMAC, V., GULEA, A. Metoda de determinare a biomasei absolut uscate de spirulină/Brevet de invenție, nr. 1078/92.08.788(RO). Publ. Buletinul de Invenții și Mărci, nr.6, 1993, România.
38. 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.
39. SHARMA, O., BHAT, T. DPPH antioxidant assay revisited. In: *Food chemistry*. 2009, vol. 113(4), pp. 1202-1205. ISSN 0308-8146.
40. 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.
41. SINGLETON, V., ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. In: *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965, vol. 16, pp. 144-158. ISSN 0002-9254.
42. SROKA, Z., CISOWSKI, W. The anti-ROS activity of various plant extracts. In: *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2005, vol. 14(3), pp. 423-433. ISSN 1899-5276.
43. SUKENIK, A., CARMELI, Y., BERNER, T. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. In: *Journal of Phycology*. 1989, vol. 25(4), pp. 686-692. ISSN (online) 1529-8817.