

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>

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
	<i>Bibliografie</i>	99

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.

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.