

**STUDIUL INFLUENȚEI UNOR COMPUȘI COORDINATIVI
AI Zn(II), Cr(III) ȘI Fe(III) ASUPRA PRODUCTIVITĂȚII ȘI CONȚINUTULUI
UNOR SUBSTANȚE BIOACTIVE ALE DUNALIELEI
LA CULTIVARE PE MEDIUL ORGANO-MINERAL
ELABORAT ÎN BAZA LICHIDULUI CULTURAL AL SPIRULINEI**

Cezara BIVOL

Catedra Biologie Vegetală

Green microalga *Dunaliella salina* is largely used in modern biotechnology due to the high content of some bioactive substances in its biomass, in special glycerol and β -carotene, and due to its high adaptation to unspecific, unfavorable culture conditions. Utilization of some coordinative compounds of metals such as Fe(III), Zn(II), Cr(III) manifests a positive effect on productivity and biochemical content of dunaliella. The highest content of carotenoids has been obtained at dunaliella cultivation in the present of 10 mg/l [Zn(L-ser)_2] and 30mg/l [Cr(Hssa)_2]Cl \cdot H $_2$ O, the highest content of glycerol – in the present of 1mg/l [$\text{Fe}_3\text{O-Ala}$].

Introducere

În ultimii ani în lume a crescut interesul specialiștilor față de preparatele obținute în baza biomasei microorganismelor fototrofe, cele mai frecvent utilizate, grație particularităților biochimice și fiziologice, fiind cianobacteria *Spirulina platensis* și microalga verde *Dunaliella salina* – surse accesibile, valoroase de substanțe biologice active de natură foarte diversă. Spirulina, datorită compoziției biochimice excepționale: 65-70% proteine, 55-58% aminoacizi, 10-15% hidrați de carbon, 3-5% lipide ș.a., este recunoscută ca cea mai solicitată sursă non-convențională ce manifestă acțiune terapeutică în tratarea a circa 70% maladii, manifestând acțiune antimicrobială, antifungică, imunomodulatoare, anticancerigenă, citoregeneratoare, antivirotică etc. [28,29,31]. Dunaliella, alături de conținutul sporit în proteine, lipide, carbohidrați, prezintă interes aplicativ datorită capacității de acumulare în condiții extreme de viață a unui conținut maxim de glicerol de peste 35% și carotenoizi, în special β -caroten, care poate atinge valori de 10% din biomasa uscată [5,8].

Carotenoizii, conform Raportului Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) pentru anul 2006, reprezintă una dintre cele mai solicitate surse de antioxidanți naturali, a căror obținere pe calea microbiologiei industriale se află printre cele mai actuale probleme ale biotehnologiei moderne [10,21].

Carotenoizii manifestă acțiune imunoprotectoare împotriva stresului oxidativ în corpul uman și animal, interacționând cu radicalii liberi ai oxigenului și peroxidului și neutralizând efectul negativ al acestora asupra celulelor și țesuturilor.

β -carotenul reprezintă precursorul vitaminei A (o moleculă de β -caroten generează în organismul animal două molecule de vitamina A), care menține funcțiile receptorului vizual, determinând capacitățile de adaptare ale acestuia în condițiile variabile de iluminare, participă în procesele de sinteză a proteinelor, lipidelor și mucopolizaharidelor, responsabile de funcționarea normală a membranelor secretoare etc. În organismul uman vitamina A se sintetizează în baza carotenoizilor doar până la nivelul necesar, evitând rezultatele negative ale hipervitaminozei cu efecte adverse asupra ficatului și a altor organe vitale, fenomen contrar în cazul administrării sursei tradiționale de vitamina A (retinol palmitat). Surplusul de carotenoizi se depozitează în celulele epidermei, conferind pielii un aspect sănătos, deosebit de important pentru oamenii cu deficiențe de pigmentație [5,18].

Dunaliella salina acumulează cantități sporite nu doar de β -caroten, ce constituie aproximativ 60,4% din carotenoizii totali ai microalgei, dar, de asemenea, astaxantină (17,7%), zeaxantină (13,4%) și criptoxantină (3,9%). Pentru plantele superioare și inferioare carotenoizii manifestă acțiune protectoare împotriva proceselor de fotooxidare. Pentru organismul animal și uman carotenoizii reprezintă componente ale sistemului defensiv, interacționând sinergetic cu alte grupe de antioxidanți naturali exercitând funcții biologice multiple [2].

În natură pigmenții carotenoizi există în diferite forme chimice; β -carotenul poate avea două structuri moleculare: *cis*- și *trans*- izomeri. β -carotenul produs sintetic conține doar *trans*-izomeri, administrarea acestuia blocând în organismul animal absorbția *cis*-carotenoizilor. În comparație cu β -carotenul sintetic, dunaliella conține ambele forme *cis*- și *trans*- de izomeri, ceea ce atribuie o valoare nutritivă foarte înaltă biomasei microalgale [23,27,33].

Abilitățile de supraviețuire ale dunaliei și beneficiile acesteia pentru umanitate au constituit de mai mulți ani obiectul cercetărilor [1,21,25]. Investigațiile recente menționează efectul carotenoizilor dunaliei de prevenire a unor forme de cancer. O serie de studii clinice au evidențiat corelația între dezvoltarea unor tumori

maligne și nivelul scăzut al carotenoizilor în sânge (izomeri *cis*- β -caroten și α -caroten: aproape unică prezență în dunaliela). În acest context, utilizarea biomasei de *Dunaliella salina* contribuie la prevenirea unor forme de cancer, asemenea tumorilor cerebrale, leucemiei, cancerului epitelial și hepatic, ulcerului etc. [18,23,32].

Studii similare afirmă că β -carotenul natural va deveni suportul farmaceutic și nutritiv primordial în metodele viitoare de prevenire și tratare a cancerului. Investigațiile efectuate pe un număr impunător de oameni au demonstrat îmbunătățirea semnificativă a stării generale a pacienților ce sufereau de cancer pulmonar, stomacal și hepatic, astmă, inflamații ale traheii și esofagului, ulcer, cu ameliorarea simultană a apetitului și somnului. β -carotenul natural previne scăderea numărului de leucocite și trombocite pe parcursul iradierilor ionice, astfel demonstrând acțiuni protectoare împotriva iradiației nucleare [3,19].

O serie de cercetări privind acțiunea extractului din dunaliela împotriva stresului oxidativ indus asupra șobolanilor de laborator prin tratarea acestora cu CCl_4 au demonstrat restabilirea funcțiilor enzimelor antioxidante (catalaza, peroxidaza, SOD) cu 50-90% la șobolanii preventiv tratați cu biomasă de dunaliela cu un conținut sporit de carotenoizi (125-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$), cele mai bune rezultate înregistrându-se la șobolanii cărora li s-a administrat un conținut maxim de carotenoizi. De asemenea, a fost observată acțiunea antioxidantă scăzută a carotenoizilor sintetici (*trans*- β -caroten), a căror administrare restabilește funcțiile enzimelor catalaza și peroxidaza doar cu 7,5-23,8%, nivelul SOD rămânând însă scăzut [12].

O serie de studii de evaluare a carotenoizilor dunaliei în calitate de coloranți alimentari au demonstrat menținerea parametrilor (greutatea corpului și a organelor vitale) și a funcțiilor fiziologice (nivelul glucozei în sânge, cantitatea glicogenului hepatic, activitatea aminotransferazei, alcalinfosfatazei, nivelul ureii și creatininei) în limitele normei la șobolanii de laborator, paralel cu scăderea conținutului de colesterol în sânge și a lipidelor hepatice, ceea ce demonstrează eficacitatea utilizării dunaliei în calitate de supliment nutritiv dietetic [2].

Astfel, deși pigmentii carotenoizi pot și sintetizați artificial sau pot fi extrași din alte surse naturale (plantele superioare), *Dunaliella salina* reprezintă una dintre cele mai bogate surse de carotenoizi, cu efecte benefice evidente [6,7].

O altă importantă substanță organică din componența biomasei de dunaliela este glicerolul. Datorită proprietăților sale fizico-chimice unice (viscozitate înaltă, higroscopie și hidrosolubilitate ridicată, toxicitate redusă), glicerolul, sau glicerina, reprezintă componentul structural de bază al majorității lipidelor, intrând, astfel, în componența tuturor membranelor biologice, a multor sisteme enzimatice. Glicerolul participă în procesul de reglare a presiunii osmotice la eucariote, determinând viscozitatea hialoplasmei celulare [13,22].

Cea mai surprinzătoare particularitate a glicerolului este numărul și varietatea proceselor metabolice în care se include. Cele mai multe din aceste căi metabolice sunt similare pentru numeroase organisme, demonstrând astfel importanța lor fundamentală și sugerând originea comună a organismelor (Tab.1).

Tabelul 1

Procesele metabolice/fiziologice în care se include glicerolul [22]

Bacterii	Drojii	Plante	Șobolani/Oameni
<ul style="list-style-type: none"> •Sursă de carbon •Sursă de energie •Osmoreglare •Crioprotecție 	<ul style="list-style-type: none"> •Sursă de carbon •Sursă de energie •Apoptosa •Menținerea potențialului redox •Transformarea fosfatului anorganic •Osmoreglare 	<ul style="list-style-type: none"> •Sursă de carbon •Sursă de energie •Menținerea potențialului redox •Osmoreglare •Crioprotecție 	<ul style="list-style-type: none"> •Gluconeogeneza •Sursă de energie •Apoptosa •Formarea tumorilor •Rezistență fizică •Homeostazia glucozei •Osmoreglare •Crioprotecție

Reieșind din cele expuse, este evident că glicerolul demonstrează proprietăți adaptive înalte pentru numeroase specii de animale și plante. Deși importanța glicerolului pentru variate căi metabolice este prezentată și posibilitatea aplicării lui în fiziopatologia anumitor dereglări este dovedită, interesul direct pentru această substanță este totuși relativ recent și, deocamdată, modest [6,22,24].

Glicerolul se aplică în industria alimentară (E422) la obținerea și conservarea produselor de patiserie, cofetărie etc., ca agent de gelificare și substituent al zahărului, care nu provoacă creșterea nivelului zahărului în sânge, preîntâmpină dezvoltarea cariilor dentare și a plăgilor bucale, deoarece nu servește în calitate de substanță nutritivă pentru microflora bucală, manifestând, astfel, acțiune bacteriostatică [9,20]. Este utilizat în vinificație determinând viscozitatea și calitățile gustative ale vinurilor și băuturilor alcoolice. Datorită acțiunii sale hidratante, lubrifiante, antiiritante și regeneratoare, glicerolul este utilizat în medicină, industria farmaceutică și în cosmetologică ca supliment al preparatelor de îngrijire a țesutului epitelial și al derivatelor lui: săpunuri, preparate destinate igienei corporale, orale, expectorante, tincturi, supozitorii etc. Ca substituent efectiv al alcoolului este întrebuințat în calitate de solvent la prepararea extractelor vegetale [25,26].

În organismul animal și uman surplusul de glicerol se depozitează în țesutul adipos sub forma triacilgliceridelor și fosfolipidelor, în caz de necesitate fiind ușor metabolizat de către hepatocite în glucoză [24].

Astfel, biomasa de *Dunaliella salina*, bogată în glicerol, reprezintă o sursă prețioasă de preparate igienice și medicamentoase cu efecte terapeutice înalt efective. Cercetările recente de studiere a activității antimicrobiene a extractului lichid obținut din biomasa de dunaliela au demonstrat acțiunea bacteriostatică și bactericidă a microalgei asupra microorganismelor *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*. Efectul antimicrobian se datorează agenților bioactivi: glicerolului, acizilor grași polinesaturați (acizii palmitic, α -linolenic și oleic), fitolului ș. a. [17].

În ultimul timp, tot mai des se discută despre utilizarea biomasei unor tulpini înalt productive de *Dunaliella salina* ca sursă alternativă de carburanți pentru industria energetică (biodisel) [4,16].

De asemenea, ca un organism vegetal, microalga *Dunaliella salina* conține o serie de hormoni vegetali – bioflavonoizi (isoflavone), care manifestă acțiune analgetică ce poate fi aplicată în tratarea durerilor [26].

Cercetările de explorare și reglare a potențialului valoros al microalgelor și cianobacteriilor, efectuate anterior în incinta LCS „Ficobiotehnologie” (USM), au evidențiat influența stimulatorie a compușilor coordinativi ai metalelor asupra productivității și compoziției biochimice a dunaliei [14,29].

Datorită rolului major pe care îl joacă metalele în desfășurarea tuturor proceselor fiziologice și biosintetice în calitate de modulatori și constituenți ai sistemelor enzimatice, reglarea capacităților celulare prin intermediul compușilor coordinativi reprezintă o direcție aparte în ficobiotehnologie, al cărei potențial este tot mai mult valorificat în prezent [11].

Un interes deosebit în cultivarea dunaliei prezintă compușii coordinativi ai fierului, cromului, zincului și cobaltului, care, administrați în mediul de cultură Ben-Amotz, asigură o creștere considerabilă a conținutului de substanțe bioactive, inclusiv de pigmenți carotenoizi și glicerol [29].

Astfel, conform tendințelor biotehnologice de obținere a unor cantități maximale posibile de biomasă, valoroasă din punct de vedere calitativ, s-a urmărit selectarea unor compuși coordinativi ai Zn(II), Cr(III) și Fe(III) în scopul stimulării productivității și conținutului de carotenoizi și glicerol în biomasa de *Dunaliella salina* la cultivare pe mediul organo-mineral, preparat în baza lichidului cultural al spirulinei.

Material și metode

Obiect de studiu a servit microalga *Dunaliella salina* CNM-AV-02 (*Volvocales*, *Chlorophyta*) inoculată pe mediul organo-mineral elaborat în baza lichidului cultural al spirulinei.

Pentru efectuarea studiului au fost investigați următorii compuși:

- compușii coordinativi ai Fe(III) cu aminoacizii glicina și alanina $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – $[\text{Fe}_3\text{O-Gly}]$ și $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Ala})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – $[\text{Fe}_3\text{O-Ala}]$ în concentrație de 1,0-10,0 mg/l;
- compușii coordinativi ai Zn(II) cu stereoizomerii serinei $[\text{Zn}(\text{D,L-ser})_2]$ și $[\text{Zn}(\text{L-ser})_2]$ în concentrație de 1,0-10,0 mg/l;
- compusul coordinativ al cromului(III) cu acidul salicilic $[\text{Cr}(\text{Hssa})_2]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ în concentrație de 10,0-30,0mg/l.

Compușii au fost suplimentați în mediul de cultură în prima zi de cultivare a dunaliei, durata cultivării – 10 zile.

Productivitatea și componența biochimică a dunaliei a fost calculată conform metodelor descrise în [15,30].

Rezultate și discuții

Conform rezultatelor experimentale obținute, toți compușii metalelor supuși studiului manifestă acțiune stimulatorie asupra productivității dunaliei (Fig.1). Acumularea maximală a biomasei are loc la administrarea compusului coordinativ $[\text{Zn}(\text{D,L-ser})_2]$ în concentrație de 10,0mg/l, conținutul de biomasă sporește cu 35,90% față de proba martor. Productivitatea dunaliei crește semnificativ și în prezența compusului coordinativ al fierului cu aminoacidul alanina – $[\text{Fe}_3\text{O-Ala}]$, în concentrație minimă administrată (1,0mg/l), și a compusului coordinativ al Cr(III) – $[\text{Cr}(\text{Hssa})_2]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, în concentrație de 30,0mg/l; conținutul de biomasă se majorează cu 27,56% și, respectiv, cu 26,28% față de martor. De asemenea, se observă că, odată cu mărirea concentrației compușilor Zn(II) și Cr(III), crește productivitatea dunaliei, fenomen invers pentru compușii coordinativi ai Fe(III), unde mărirea concentrației de compus reduce acumularea biomasei microalgale. Cea mai mică valoare a productivității s-a înregistrat în prezența compusului coordinativ $[\text{Cr}(\text{Hssa})_2]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ în concentrația de 10,0mg/l, conținutul de biomasă sporind cu 10,26%.

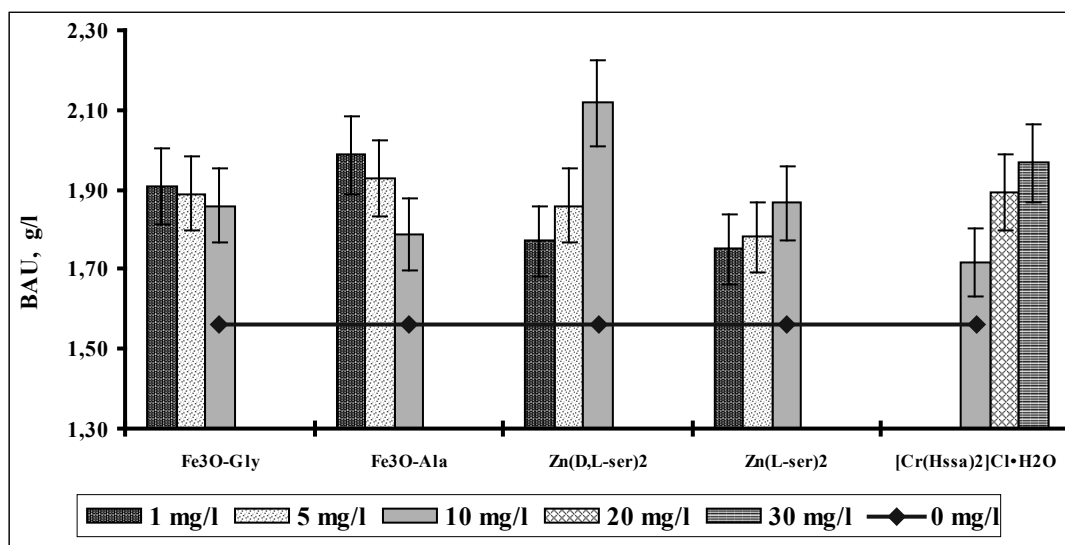


Fig.1. Productivitatea dunaliei cultivate pe mediul organo-mineral în prezența unor compuși ai metalelor Fe(III), Zn(II) și Cr(III).

Studiul influenței compușilor coordinați cercetați asupra conținutului de pigmenți carotenoizi acumulați în biomasa de *Dunaliella salina* a evidențiat un spor semnificativ al acestora, care manifestă tendințe de majorare odată cu mărirea concentrației compusului (Fig.2). Cele mai înalte valori se înregistrează în prezența compusului coordinați $[Zn(L-ser)_2]$ administrat în mediu în concentrație de 10,0 mg/l și în prezența compusului coordinați $[Cr(Hssa)_2]Cl \cdot H_2O$ administrat în concentrație de 30,0 mg/l, conținutul de carotenoizi sporind cu 38,00% și, respectiv, cu 35,63% față de proba de referință. Cele mai mici rezultate au fost evidențiate pentru compusul coordinați al Fe(III) cu aminoacidul glicina – $[Fe_3O-Gly]$ administrat în concentrația minimă studiată de 1,0 mg/l, conținutul de carotenoizi majorându-se cu 5,70% față de martor.

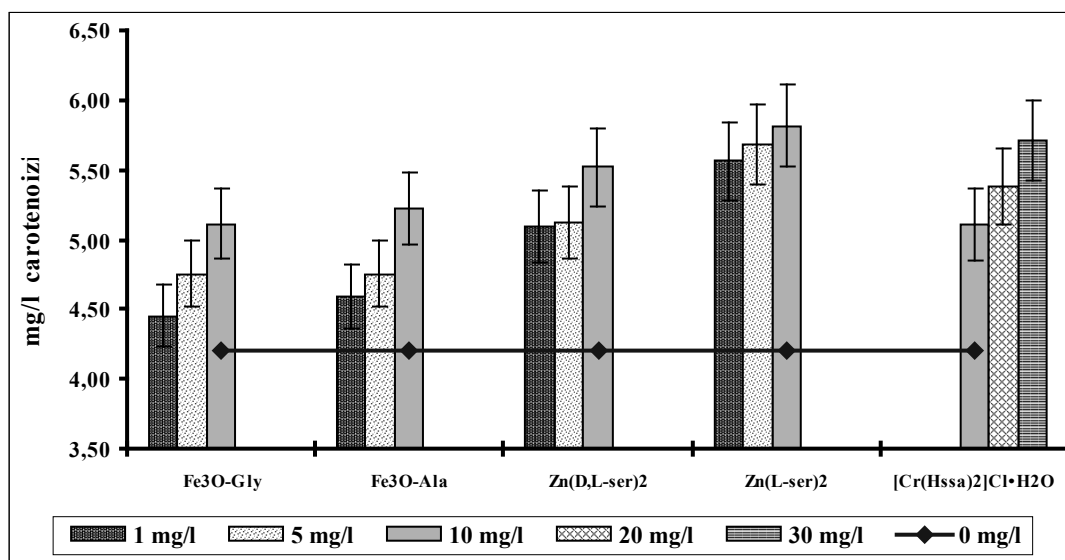


Fig.2. Conținutul de carotenoizi la cultivarea dunaliei pe mediul organo-mineral în prezența unor compuși ai metalelor Fe(III), Zn(II) și Cr(III).

Rezultatele influenței compușilor investigați asupra conținutului de glicerol în biomasa dunaliei prezintă variații specifice, determinate de tipul și concentrația compusului administrat în procesul cultivării (Fig.3). Astfel, compușii coordinați ai Fe(III) și Cr(III) în concentrațiile minime studiate acționează stimulator asupra acumulării glicerolului în biomasă.

Cea mai înaltă valoare se înregistrează în prezența $[Fe_3O-Ala]$ în concentrație de 1,0 mg/l, conținutul de glicerol sporind cu 11,96% față de martor. Cu majorarea concentrației compușilor scade, însă, conținutul de glicerol, pentru $[Fe_3O-Gly]$ și $[Cr(Hssa)_2]Cl \cdot H_2O$ chiar sub nivelul martorului.

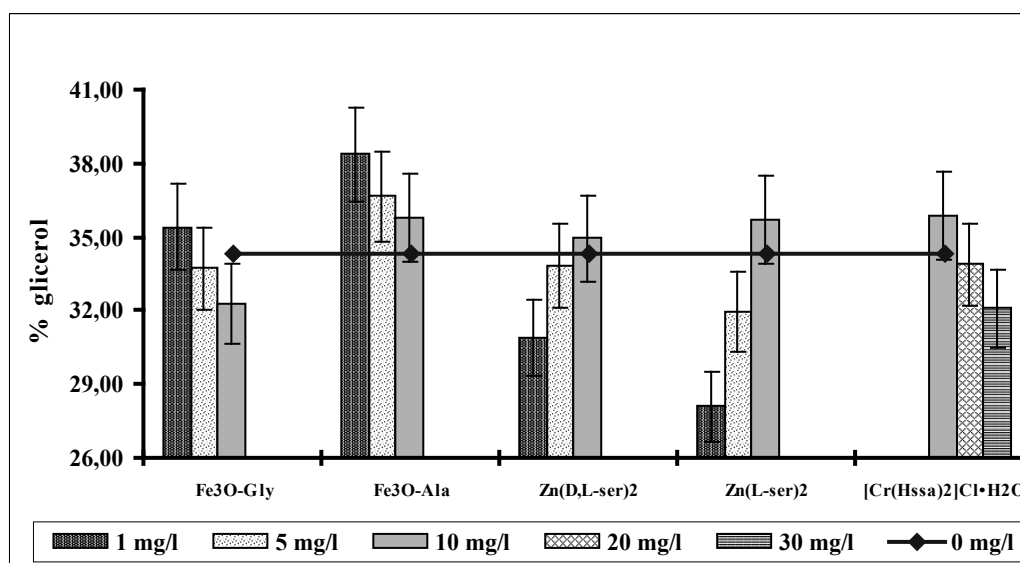


Fig.3. Conținutul de glicerol la cultivarea dunaliei pe mediul organo-mineral în prezența unor compuși ai metalelor Fe(III), Zn(II) și Cr(III).

Un fenomen diferit se observă în cazul compușilor coordinativi ai Zn(II) care stimulează acumularea glicerolului odată cu mărirea concentrației. Aceste majorări sunt, însă, nesemnificative, constituind 4,23% față de martor pentru $[Zn(L-ser)_2]$ administrat în concentrația maximă studiată de 10,0mg/l. Probele cultivate în prezența concentrațiilor mici ale compușilor coordinativi ai Zn(II) evidențiază valori sub nivelul martorului, cel mai mic conținut al glicerolului înregistrându-se la administrarea $[Zn(L-ser)_2]$ în concentrație de 1,0 mg/l (cu 18,06% mai puțin față de proba de referință).

Concluzii

Cercetările efectuate au scos în evidență 3 compuși coordinativi, care asigură o productivitate sporită și un conținut maxim de carotenoizi și glicerol în biomasa de dunaliela: $[Zn(L-ser)_2]$, $[Cr(Hssa)_2]Cl \cdot H_2O$ în concentrație de 10 mg/l, $[Cr(Hssa)_2]Cl \cdot H_2O$ în concentrație de 30 mg/l și, respectiv, $[Fe_3O-Ala]$ în concentrație de 1 mg/l. În baza lor pot fi elaborate procedee noi de obținere a biomasei de dunaliela bogată în carotenoizi și glicerol – substanțe organice cu multiple efecte curative.

Referințe:

- Abalde J., Herrero C. β -carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. – In: Bioresour. Technol., 1991, vol. 38, no.2-3, p.121-125.
- Abd El-Baky H. et al. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. – In: Int. J. Agri. Biol., 2004, vol.6, no.1, p.49-57.
- Astley S. et al. DNA damage and susceptibility to oxidative damage in lymphocytes: effects of carotenoids in vitro and in vivo. – In: British J. Nutr., 2004, vol.1, p.53-61.
- Becker E. Microalgae. Biotechnology and Microbiology. Cambridge Studies. – In: Biotechnology, Cambridge: Cambridge University Press, 1994. – 293 p.
- Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. In: Plant Physiol., 1989, vol.91, p.1040-1043.
- Ben-Amotz A., Sussman I., Avron M. Glycerol production by *Dunaliella*. – In: Experientia, 1982, vol.38, p.49-52.
- Bhosale P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. – In: Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, vol.63, no.4, p.351-361.
- Borowitzka M. Microalgae as source of pharmaceutical and other biologically active compounds. In: Journal of Applied Phycology, 1995, no.7, p.3-15.
- Boussiba S. Commercial production of pigments and antioxidants from microalgae. In: 8th Internat. Conference on Applied Algology, Book of Abstracts, Montecatini-Terme, 1999, p.239.
- Carotenoid News, 2007, vol.17, no.2, www.carotenoidsociety.org.
- Cepoi L. Particularitățile fiziologo-biochimice de cultivare a algei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 – sursă de substanțe bioactive: Autoreferatul tezei de doctor în biologie. Chișinău, 1995. – 21 p.
- Chidambara M. et al. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* – a green microalgae. – In: Life Science, 2005, vol.76, Issue 12, p.1381-1390.

13. Cronwright G., Rohwer J., Prior B. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. – In: Appl. Envir. Microbiol., 2002, vol.68, p.4448-4456.
14. David S. et al. Productivitatea și componența biochimică a microalgei verzi *Dunaliella salina* Calu-834 la cultivarea în prezența compușilor coordianțivi ai Zn (II). – În: Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice” 2005, p.241-243.
15. Duca M., Savca E., Port A. Fiziologia vegetală. Tehnici speciale de laborator. – Chișinău: CE USM, 2001. – 173 p.
16. Gouveia L. et al. Harvesting of *Dunaliella salina*: technical and economical evaluation. – In: Biotechnology of microalgae: 3rd European Workshop, Abstracts, 1997, p.36.
17. Herrero M. et al. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. – In: J. Food Prot., 2006, vol.69, Issue 10, p.2471-2477.
18. Hieber D. et al. Comparative effect of all-trans beta-carotene vs. 9-cis beta-carotene on carcinogen-induced neoplast transformation and connexin 43 expression in murine 10 T ½ cells and on the differentiation of human keratinocysts. – In: Nutr. Cancer., 2000, vol.37, no.2, p.234-244.
19. Jyonouchi H. et al. Immunomodulating actions of carotenoids: Enhancement of in vivo and in vitro antibody production to T-dependent antigens. – In: Nutr. Cancer., 1994, vol.21, p.47-58.
20. Knutsen G., Hansen K. Bioactive substances from marine microalgae and cyanobacteria : from sea to screen. – In: Abstracts of the 4th European Workshop Biotechnology of microalgae, Bergholz-Rehrbrücke, 2000, p.70.
21. Leach G., Oliveira G., Morais R. Spray-Drying of *Dunaliella salina* to produce β-carotene rich powder. – In: J. Industr. Microbiol. Biotechnol., 1998, vol.20, no.2, p.82-85.
22. Lefebvre O. Application des microorganismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins: These pour obtenir le grade de Docteur de L'ecole nationale superieure Agronomique de Montpellier, 2005. – 270 p.
23. Levya Y. et al. Dietary supplementation of a natural isomer mixture of beta-carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus. – In: Annals of Nutrition & Metabolism, 2000, vol.44, no.2, p.54-60.
24. Narayan M. et al. Utilization of glycerol as carbon source on the growth, pigment and lipid production in *Spirulina platensis*. – In: Int. J. Food Sci. Nat, 2005, vol.56, p.521-528.
25. Phadwal K., Singh P. Isolation and characterization of an indigenous isolate of *Dunaliella* sp. for beta-carotene and glycerol production from a hypersaline lake in India. – In: J. Basic Microbiol., 2003, vol.43, p.423-429.
26. Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. – In: Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, vol.65, no.6, p.635-648.
27. Rathinam R. et al. Protective effect of *Dunaliella salina* (*Volvocales, Chlorophyta*) against experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. – In: Microbiol. Research, 2006, vol.162, Issue 2, p.177-184.
28. Rudic V. BioR – Studii biomedicale și clinice. – Chișinău: Elena V.I., 2007. – 376 p.
29. Rudic V. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. – Chișinău: Elena V.I., 2007. – 364 p.
30. Rudic V. și alții. Metode de investigație în ficobiotehnologie. – Chișinău: CE USM, 2002. – 61 p.
31. Santoyo S. et al. Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. – In: European Food Research and Technology, 2006, vol. 224, no.1, p.75-81.
32. Schwartz J. et al. Prevention of experimental oral cancer by extracts of *Spirulina-Dunaliella* algae. – In: Nutr.Cancer., 1988, vol.11, no.2, p.127-134.
33. Terao J. Antioxidant activity of beta-carotene related carotenoids in solution. – In: Lipids, 1989, no.24, p.659-662.

Prezentat la 18.12.2009